

Emanuely da Silva Chrun

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS
HDAC1, HDAC2 E HAT1 EM QUEILITES ACTÍNICAS E
CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE LÁBIO**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Filipe Ivan
Daniel

Coorientador: Prof. Dr. Filipe Modolo
Siqueira

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Chrun, Emanuely da Silva

EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PRÓTEÍNAS HDAC1, HDAC2
E HAT1 EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE
LÁBIO / Emanuely da Silva Chrun ; orientador, Filipe Ivan
Daniel ; coorientador, Filipe Modolo. - Florianópolis,
SC, 2016.

95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós
Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Câncer Labial. 3. Queilite Actínica.
4. Histona Desacetilases. 5. Histona Acetiltransferases.
I. Daniel, Filipe Ivan . II. Modolo, Filipe . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Odontologia. IV. Título.

Emanuely da Silva Chrun

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS
HDAC1, HDAC2 E HAT1 EM QUEILITES ACTÍNICAS E
CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE LÁBIO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Odontologia”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2016.

Prof.^a. Dr.^a Izabel Cristina Santos Almeida
Coordenadora do PPGO

Banca Examinadora:

Dr. Filipe Ivan Daniel
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Lisiane Candido
Membro Externo
Prefeitura Municipal de Florianópolis

Prof. Dr. Rogério de Oliveira Gondak
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

*À minha família,
Aos meus pais e minha irmã, que são meu
porto seguro, meu exemplo e minhas forças,
sempre juntos independente da distância.
Ao meu esposo que está sempre ao meu lado
me incentivando a lutar pelos meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus**, pela vida! Pelas oportunidades que me oferece e pelas pessoas que coloca em meu caminho.

Ao meu esposo, **Luann**, que me incentivou a buscar este sonho e me ajudou diariamente a realizá-lo! Por seu carinho, seu amor incondicional, pela sua dedicação e cuidado com a nossa família. Por suas renúncias em meu favor, por sua preocupação com a minha realização pessoal e profissional! Obrigada por me proporcionar esta conquista e ser meu melhor companheiro!

Aos meus pais, **Edamara** e **Emilson**. Por cada um dos meus passos, guiados por vocês. Me mostraram como caminhar com seu exemplo de garra e fé; me ensinaram a caminhar segurando pela mão com sua paciência, carinho e atenção que nunca faltam; me ensinaram a levantar dos tombos sempre com confiança e olhando o problema pelo melhor ângulo, tudo sempre tem um lado positivo; me ensinaram a sentar e observar o caminho e ser grata por tudo e todos os que me acompanham nele. Além de tudo isso sempre estão prontos, fazendo o possível e o impossível pelos meus objetivos e minha felicidade. Não cansarei de dizer: Obrigada por tudo sempre, tudo o que sou devo a vocês!

À minha irmãzinha, **Eduarda**. Por ser meu apoio, minha amiga! Por estar sempre presente, por cuidar dos nossos pais, por fazer a sua e a minha parte!

Aos meus tios, **Élcio** e **Luciane** e os primos, **Ricardo** e **Leonardo** que dividiram comigo sua casa e sua família durante a minha graduação e continuaram presentes. Pela sua paciência e apoio nas minhas realizações!

Á minha avó, **Maria**, por sua fé e orações!

Aos meus sogros, **Salete** e **Elio Chrun**, que torcem pelo meu sucesso!

Aos meus amigos, **Ellen**, **Lais** e **Neimar**, **Carolina**, **Mirian**, **Patrícia**, **Adriano** e **Fernanda** que torcem pelas minhas realizações, comemoram as minhas conquistas, dividem comigo as ansiedades e fazem os meus dias mais felizes!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor **Filipe Daniel**, meu orientador, por sua dedicação e paciência. Por estar sempre presente, ser sempre muito atencioso e responder sempre rapidamente e de forma cordial às minhas dúvidas e ao meu trabalho. Cada passo para mim foi um grande aprendizado, o senhor é um exemplo de professor que eu quero seguir.

Ao Professor **Filipe Modolo**, meu coorientador, por sua confiança, apoio e incentivo. Por tornar mais simples a visão da vida acadêmica, desde a graduação.

Aos professores do **Departamento de Patologia** e afins que sempre estiveram prontos para ensinar com gosto e atenção:

À Professora **Sônia Maria Lückmann Fabro**, que com sua confiança no meu trabalho, incentivo e carinho, me abriu muitas portas. À Professora **Maria Inês Meurer**, Maninha, com seu carinho e dedicação, por tornar nossos dias e nosso caminho mais leve. À Professora **Liliane Janete Grando**, por sua dedicação e seu prazer de fazer o que faz, é sempre uma inspiração. À Professora **Elena Riet Correa Rivero**, com quem dividi minhas ansiedades, por sua dedicação e apoio. Ao Professor **Rogério de Oliveira Gondak**, pela sua paciência admirável e gosto pelo ensino, sempre à disposição para ensinar com serenidade. À Professora **Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro** por sua generosidade em dividir com muita paciência e carinho os seus conhecimentos.

Aos Professores **Rodrigo Otávio Alves de Lima**, **Felipe Daltoé**, **Alessandra Camargo**, **Etiene Munhoz**, **Inês Beatriz Rath** e **Aira Bonfim** que dividiram comigo seus conhecimentos e experiências. Por sua atenção, dedicação e paciência.

À Professora **Renata Goulart Castro** que deu atenção as minhas incessantes “dúvidas estatísticas”. Por sua dedicação e paciência.

À Dr.^a **Lisiane Cândido**, por aceitar participar da minha banca, dedicando parte do seu tempo ao meu trabalho.

À Sra. **Vânia Regina Cardoso da Silva** (Dona Vânia, Vaninha), pelos cafezinhos e sorrisos de “Bom dia”! Por ter feito parte de toda a minha formação, sempre disposta a ajudar.

À minha amiga **Grasieli de Oliveira Ramos**, que sempre esteve disposta a me ajudar em todas as minhas dificuldades e dúvidas.

À **Soraia Rosa Alves**, antes aluna de iniciação científica, hoje colega Cirurgiã-dentista, que me ensinou, com carinho e disposição, a realizar toda a parte laboratorial do meu trabalho. Por sua paciência e dedicação.

Aos meus amigos e companheiros de pós-graduação: **Caroline Zimmermann, Jussara Maria Gonçalves, Maria del Rosário Nunes (Charo), Georgia Martini, Diogo Lenzi Capella, Guilherme Henrique Ribeiro, Mariah Luz Lisboa, Gabriel Louzeiro, Angélica Reinheimer, Rúbia Stuepp, Fernanda Scotti, Bianca Carla Bianco.** Por todos os aprendizados e desafios compartilhados, com certeza esse caminho foi mais fácil ao lado de vocês!

Ao **Laboratório de Patologia Bucal-UFSC** e ao **Dr. Tiago Bortolotto**, que enquanto funcionário do mesmo, sempre se apresentou disposto a me auxiliar. Por sua dedicação e ensinamentos.

Ao **Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC**, que me permitiu realizar as reações necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos pacientes do **Ambulatório de Estomatologia-HU-UFSC**, por sua confiança e colaboração no meu aprendizado.

Ao **PPGO**, em especial à Professora **Izabel Cristina Santos Almeida**, por sua dedicação e empenho na coordenação do Programa.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos.

“A maior parte das coisas importantes do mundo foram realizadas por pessoas que continuaram tentando quando parecia não haver esperança de modo algum”

(Dale Carnegie)

RESUMO

A acetilação de histonas é uma das alterações epigenéticas que tem sido reconhecida como um processo fundamental com fortes efeitos na regulação da transcrição dos genes. A expressão das enzimas modificadoras de histonas: histonas desacetilases (HDAC) e histona acetiltransferases (HAT), tem sido avaliada em diferentes tipos de tumores malignos. Este trabalho teve como objetivo investigar a expressão de HDAC1, HDAC2 e HAT1, em carcinoma epidermoide de lábio (CEL) e queilite actínica (QA). Para tanto foi realizada uma revisão da literatura e, foram avaliados, através de imuno-histoquímica, 30 casos de CEL e 30 casos de QA além de 28 casos de epitélio não neoplásico (ENN), como controle. Houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de porcentagem de imunopositividade de HDAC2 entre os grupos de QA ($75,07\% \pm 29,70$) e CEL ($51,06\% \pm 39,02$) (Teste de Kruskal-Wallis, $p=0,022$). Para HDAC1 as porcentagens de imunomarcção foram de $77,49\%$ ($\pm 24,95$) no grupo das QA, $74,76\%$ ($\pm 25,78$) nos CEL e $67,73\%$ ($\pm 29,14$) no grupo dos ENN (Teste de Kruskal-Wallis, $p=0,3625$) enquanto para HAT1, as QA mostraram média de imunopositividade de $89,59\%$ ($\pm 13,12$), os CEL $87,02\%$ ($\pm 14,56$), e os ENN $84,81\%$ ($\pm 19,67$) (Teste de Kruskal-Wallis, $p=0,7134$). Os resultados mostraram maiores níveis de imunopositividade nas QA e nos CEL para HDAC1, HDAC2 e HAT1 em relação ao ENN em grande parte dos casos. A confirmação futura de que estas alterações possam estar envolvidas no desenvolvimento do câncer de lábio, facultará a sua utilização como marcadores de diagnóstico e prognóstico, especialmente das lesões potencialmente malignizáveis, e será imprescindível para evitar ou reduzir procedimentos cirúrgicos por vezes mutiladores por permitir o uso de inibidores de HDAC (HDACi) no tratamento dessas lesões.

Palavras-chave: Histonas Desacetilases, Histona Acetiltransferases, Carcinoma Epidermoide, Lábio, Queilite, Imuno-histoquímica

ABSTRACT

Histone acetylation, an epigenetic change, has been recognized as a fundamental process with strong effects on regulation of gene transcription. Expression of histone modifying enzymes: Histone deacetylases (HDACs) and histone acetyltransferases (HAT), has been evaluated in different types of malignant tumors. This study aimed to investigate the expression of HDAC1, HDAC2 and HAT1 in squamous cell carcinoma of the lip (SCCL) and actinic cheilitis (AC). For this, 30 cases of SCCL and 30 cases of AC, as well as 28 cases of non-neoplastic epithelium (NNE), used as a parameter, were evaluated through immunohistochemistry. There was a statistically significant difference between mean percentages of immunopositivity for HDAC2 AC groups ($75.07\% \pm 29.70$) and SCCL ($51.06\% \pm 39.02$) (Kruskal-Wallis test, $p = 0.022$). HDAC1 immunostaining percentages were $77.49\% (\pm 24.95)$ in the AC group, $74.76\% (\pm 25.78)$ in the CEL, and $67.73\% (\pm 29.14)$ in the group of NNE. For HAT1, AC showed a mean immunopositivity of $89.59\% (\pm 13.12)$, SCCL of $87.02\% (\pm 14.56)$, and NNE of $84.81\% (\pm 19.67)$. Results showed higher levels of immunopositivity in AC and SCCL to HDAC1, HDAC2 and HAT1 compared to NNE in large part of the cases. Future confirmation that these alterations are involved in the development of lip cancer, would provide their use as diagnostic and prognostic markers, especially precancerous lesions, and is essential for avoiding or reducing surgical procedures, often maiming, for allowing the use of HDAC inhibitors (HDACi) in the treatment of these injuries.

Keywords: Histone deacetylases. Histone acetyltransferases. Squamous cell carcinoma. Lip. Actinic cheilitis. Immunohistochemistry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cortes histológicos observados a olho nu.....	33
--	----

Artigo de Revisão

Figura 1 – Ação das HATs e HDACs.....	38
Figura 2 – Modificações estruturais da histona mediadas pela HAT e HDAC.....	39
Figura 3 – Ilustração de hipóteses de complexos correpressores envolvendo HDACs.....	40

Artigo de Pesquisa

Gráfico 1 – Distribuição das médias de porcentagem de núcleos positivos para HDAC1, HDAC2 e HAT1 nos grupos dentro da amostra estudada.....	71
Gráfico 2 – Intervalos de confiança das porcentagens de núcleos positivos para HDAC1, HDAC2 e HAT1 nos grupos pesquisados.....	73
Gráfico 3 – Distribuição das médias de porcentagem de núcleos positivos para HDAC1, HDAC2 e HAT1 nas QA, conforme o grau de displasia.....	74
Gráfico 4 – Distribuição das médias de porcentagem de núcleos positivos para HDAC1, HDAC2 e HAT1 nas QA, de acordo com a classificação binária.....	74
Gráfico 5 – Distribuição das médias de porcentagem de núcleos positivos para HDAC1, HDAC2 e HAT1 nos CEL, de acordo com a diferenciação histopatológica.....	74

LISTA DE QUADROS

Artigo de Revisão

Tabela 1 – Resumo dos estudos de expressão de HDACs em cânceres em seres humanos e linhagens de células.....	42
Tabela 2 – Exemplos de genes provavelmente silenciados pelas HDACs e inibidores utilizados para a re-expressão dos genes.....	48
Tabela 3 – Resumo do envolvimento das HATs mais estudadas e seus genes alvo no câncer.....	49
Tabela 4 – Inibidores de HDAC aprovados pela FDA e pesquisas envolvendo esses medicamentos.....	51

Artigo de Pesquisa

Tabela 1 – Características dos participantes do estudo.....	70
Tabela 2 – Incidência de imunomarcção nuclear para HDAC1.....	71
Tabela 3 – Incidência de imunomarcção nuclear para HDAC2.....	72
Tabela 4 – Incidência de imunomarcção nuclear para HAT1.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HDAC – Histona Desacetilases
HAT – Histona Acetiltransferases
CEL – Carcinoma Epidermoide de Lábio
QA – Queilite Actínica
ENN – Epitélio Não Neoplásico
HDACi – inibidores de HDAC
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
UV – Radiação Ultravioleta
INCA – Instituto Nacional do Câncer
ERNN – Epitélio de Revestimento Não Neoplásico
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
LPB – Laboratório de Patologia Bucal
SAP – Serviço de Anatomia Patológica
HU – Hospital Universitário
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
CEPSH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
HE – Hematoxilina e Eosina
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – Tampão fosfato
RNA – Ácido Ribonucleico
miRNA – micro RNA
TMA – Microarranjos Teciduais
IHQ – Imuno-histoquímica
WB – *Western-Blot*
RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa
IF – Imunofluorescência
qRT-PCR – RT-PCR em Tempo Real
FC – Citometria de Fluxo
N – Nuclear
C – Citoplasmática
N/C – Nuclear e Citoplasmática
TSA – Tricostatin A
VPA – Ácido Valpróico
SFN – Sulforafane
SAHA – Ácido Hidroxâmico Suberoilânilida
FDA – *Food and Drug Administration*
GNAT – *Gcn5-related N-acetyltransferases*
Gcn5 – *General control non-repressible 5*

LISTA DE SÍMBOLOS

μm – Micrômetros

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

% - Por cento

M – Molar

pH – Potencial hidrogeniônico

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

↑ - expressão aumentada

↓ - expressão diminuída

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 OBJETIVOS.....	29
1.1.1 Objetivo Geral.....	29
1.1.2 Objetivos Específicos.....	29
2 METODOLOGIA EXPANDIDA.....	31
2.1 DELINEAMENTO.....	31
2.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	31
2.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	31
2.4 REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	32
2.5 AVALIAÇÃO DA REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	33
3 ARTIGOS.....	35
3.1 ARTIGO DE REVISÃO.....	35
3.2 ARTIGO DE PESQUISA.....	65
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
5 CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS.....	87
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	91
ANEXO A – Parecer consubstanciado.....	93

1 INTRODUÇÃO

A epigenética refere-se à regulação da expressão do gene sem alterações na sequência de nucleotídeos do DNA, sendo herdável durante divisão celular e reversível (Feinberg e Tycko, 2004). Sabe-se que modificações epigenéticas, incluindo as modificações em histonas, desempenham um papel importante no desenvolvimento de tumores malignos.

A unidade fundamental da cromatina é o nucleossomo. As histonas, por sua vez, são as proteínas empacotadoras da molécula de DNA nessa estrutura (Luger *et al.*, 1997). Enzimas relacionadas com histonas (histona acetiltransferases [HATs] e histona desacetilases [HDACs]) podem influenciar a transcrição do DNA através do equilíbrio entre a acetilação e desacetilação das histonas (Yoo e Jones, 2006). A identificação dessas enzimas representou um marco na compreensão das funções biológicas decorrentes dessas modificações de histonas, já que forneceu a primeira evidência direta ligando, inequivocamente, os estados de modificação da histona à regulação da transcrição (Marmorstein e Trievel, 2009).

As HATs, em suma, promovem a acetilação das proteínas histonas através da catalisação da transferência de um grupamento acetil da acetil-CoA para os resíduos de lisina das histonas, fazendo com que as mesmas, antes carregadas positivamente, sejam neutralizadas, diminuindo sua atração com o DNA com carga negativa, levando à descompactação da cromatina e, assim, permitindo o processo de transcrição (Ropero e Esteller, 2007). As principais acetiltransferases estudadas estão distribuídas em quatro famílias de acordo com a sua estrutura primária. Dentre elas, na família GNAT (*Gcn5-related-N-acetyltransferase*), está a HAT1 (Dekker e Haisma, 2009), conhecida como uma HAT do tipo B, inicialmente detectada no citoplasma e com função na acetilação de histonas recém-sintetizadas (Roth, Denu e Allis, 2001). No momento, sabe-se que também apresenta distribuição nuclear e suas funções vão além da acetilação dessas histonas, mas ainda não estão claramente estabelecidas (Verreault *et al.*, 1998; Parthun, 2013), embora tenha sido reconhecida como fundamental na clonogenicidade e capacidade de divisão celular de adenocarcinoma uterino (Tafrova e Tafrov, 2014).

Já as HDAC promovem a remoção do grupamento acetil dos resíduos de lisina agindo de forma contrária, colaborando com o silenciamento do gene (Ropero e Esteller, 2007; Min *et al.*, 2012). Por estudos bioquímicos e genéticos foram identificados diversos complexos

de enzimas que têm ação sobre a acetilação de histonas e atração de outros fatores importantes para a transcrição gênica, sendo assim, funções diferenciadas para as acetiltransferases têm sido publicadas na literatura. A expressão dessas proteínas (HAT e HDAC) tem sido avaliada em diferentes tumores malignos humanos (Krusche *et al.*, 2005; Nakagawa *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2009; Hayashi *et al.*, 2010; Gruhn *et al.*, 2013; Giaginis *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015). Essas pesquisas têm se voltado para este campo no intuito de esclarecer os mecanismos de atuação de genes alterados nesse processo e seus respectivos produtos, especialmente na transformação maligna de lesões potencialmente malignizáveis. Paralelamente, ensaios clínicos com diferentes inibidores de HDAC para utilização como drogas antitumorais estão em curso (Marks e Xu, 2009).

Dentre as 18 isoformas de HDAC distribuídas em quatro classes, as HDAC1 e HDAC2, são as mais investigadas (Halkidou *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2004; Krusche *et al.*, 2005; Ishihama *et al.*, 2007; Krusche *et al.*, 2007; Nakagawa *et al.*, 2007; Weichert *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2009; Adams *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2010; Theocharis *et al.*, 2011; Muller *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014). A inibição combinada de HDAC1 e HDAC2 em diferentes tipos de células levou à diminuição na proliferação e aumento da apoptose de células neoplásicas, apoiando a ideia de que ambas as enzimas são alvos relevantes para a terapia de tumores (Jurkin *et al.*, 2011)

A queilite actínica (QA) é uma doença potencialmente cancerizável – mais especificamente em carcinoma epidermoide de lábio (CEL) – que acomete a semimucosa labial, mais comumente a inferior, e resulta da exposição crônica à radiação ultravioleta (UV) (Jadotte e Schwartz, 2012; Calcaianu *et al.*, 2015). A exposição excessiva ao sol foi apontada na estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2016/2017 representando 3% dos principais fatores de risco para o câncer (BRASIL, 2015). Esse tipo de radiação possui propriedades capazes de interferir no bom funcionamento dos processos biológicos, predispondo a mutações pela produção de dímeros de pirimidinas (Beani, 2014), ou sua atuação sobre as células do sistema imune, prejudicando a resposta imunológica contra antígenos neoplásicos (imunotolerância) (Granstein e Matsui, 2004), favorecendo a carcinogênese. Juntamente com a melanina, o caroteno e o ácido hialurônico, o DNA genômico tem afinidade pela radiação UVB (Van Laethem *et al.*, 2005) e essa afinidade pode facilitar a ocorrência de mutações. Ainda, já tem sido comprovado que essa exposição pode

levar também a modificações epigenéticas (Gronniger *et al.*, 2010) que corroboram com a iniciação e/ou progressão da fotocarcinogênese.

Neste estudo, realizou-se uma cuidadosa revisão da literatura buscando analisar estudos que reportaram o processo de modificação de histonas, as enzimas associadas e os genes afetados em diferentes neoplasias malignas humanas. E, investigou-se a expressão imuno-histoquímica das proteínas HDAC1, HDAC2 e HAT1 em tecido não neoplásico, queilite actínica e carcinoma epidermoide de lábio, ainda não relatada na literatura, com o intuito de melhorar o entendimento das alterações moleculares que ocorrem nos diferentes estágios dessas lesões fotoinduzidas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar a expressão de HDAC1, HDAC2 e HAT1 em lesões potencialmente cancerizáveis do tipo queilite actínica (QA) e no carcinoma epidermoide de lábio (CEL).

1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar a imunexpressão das proteínas HDAC1, HDAC2 e HAT1 em tecido não neoplásico, QA, CEL e no epitélio de revestimento não neoplásico adjacente às áreas de invasão tumoral nos CEL (ERNN-CEL).
- Comparar a expressão das proteínas entre os grupos estudados, com a diferenciação histopatológica nos CEL e com o grau de displasia epitelial nas QA.
- Correlacionar os níveis de expressão das proteínas HDAC1, HDAC2 e HAT1 entre si.

2 METODOLOGIA EXPANDIDA

2.1 DELINEAMENTO

Este é um estudo retrospectivo observacional transversal descritivo e exploratório.

2.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi composta por 30 casos de lesão potencialmente cancerizável do tipo Queilite Actínica (QA); 30 casos de Carcinoma Epidermoide de Lábio (CEL). Como grupo controle foram utilizados 28 casos de epitélio não neoplásico (ENN) provenientes de mucocelos de lábio com revestimento de epitélio de mucosa, desprovidas de componente inflamatório, em que os pacientes não apresentavam alterações imunológicas ou tratamento antineoplásico prévio, devido à inviabilidade de obtenção de fragmentos de lábio saudável. Estas amostras teciduais foram selecionadas, por conveniência, do arquivo de casos do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB-UFSC) e do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário (SAP-HU) da UFSC, e utilizadas com o consentimento do paciente ou responsável diante da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNCICE A). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (Parecer número 1.020.518). Não foram selecionadas amostras múltiplas do mesmo paciente e nenhum deles havia recebido tratamento quimioterápico ou radioterápico até o momento da obtenção do material.

2.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os cortes histológicos corados com Hematóxilina e Eosina (HE) foram analisados simultaneamente por dois examinadores previamente calibrados que determinaram e confirmaram o diagnóstico. Para os casos de QA foi determinado o grau de displasia epitelial, de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2005 (Barnes *et al.*, 2005) e pela classificação binária de Kujan *et al.* (2006) (Kujan *et al.*, 2006). Para os casos de CEL foi determinado o grau de diferenciação histopatológica, segundo os critérios estabelecidos pela OMS (Pindborg *et al.*, 1997; Barnes *et al.*, 2005). Foram excluídos da amostra os casos em que houve discordância quanto ao diagnóstico ou classificação, ou que a realização da reação imuno-histoquímica foi inexequível, pela necessidade de preservação de material em arquivo.

2.4 REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os procedimentos para realização da técnica imuno-histoquímica foram realizados no Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Odontologia. A detecção das enzimas estudadas foi realizada por meio de imuno-histoquímica com o método estreptavidina-biotina-peroxidase.

Os espécimes, fixados em formol a 10% à temperatura ambiente, conforme protocolo e dados da ficha de biópsia do LPB-UFSC, e embebidos em parafina, foram seccionados a 3µm de espessura, para cada antígeno, e estendidos, em lâminas previamente silanizadas, levadas a estufa por 12 horas à 60°C. Para a desparafinização dos cortes, as lâminas foram mantidas em estufa por 90 minutos a 75°C, seguido de 30 minutos em xilol a 60°C e 20 minutos em xilol a temperatura ambiente. Logo após foi realizada a reidratação em uma sequência decrescente de etanol constituída por cinco passagens de cinco minutos cada, começando por 3 banhos em etanol absoluto, seguida pelo etanol a 95% e etanol a 85%. Logo após foram realizados dois banhos de 5 minutos em água destilada.

O bloqueio da peroxidase endógena ocorreu em H₂O₂ a 6% em metanol na proporção de 1:3, em dois banhos de 20 minutos, seguido de um banho de 5 minutos em Tampão Fosfato (PBS) e uma lavagem de 5 minutos em água destilada. Para a recuperação antigênica utilizou-se tampão citrato 0,01M, pH 6,0, pré-aquecido em banho-maria, por 40 minutos em temperatura constante de 96°C. Aguardou-se esfriar por 30 minutos e procederam-se dois banhos de 5 minutos em PBS. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado em solução de leite desnatado a 5% em PBS durante 60 minutos, à temperatura ambiente, seguidos por mais dois banhos de 5 minutos em PBS. Cada espécime foi delimitado com caneta hidrofóbica (Z-path, Bancoque, Tailândia) e, então, foram incubados com os anticorpos anti-HDAC1 (SC7872, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA, diluição 1:200), anti-HDAC2 (SC7899, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA, diluição 1:200) e anti-HAT1 (SC8752, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA, diluição 1:500) a 4°C *overnight*. Após dois banhos de 5 min em PBS, procedeu-se a utilização do Kit LSAB (Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA) com anticorpo secundário biotinilado e complexo estreptavidina-biotina-peroxidase, seguindo de 2 banhos de 5 minutos em PBS. Para revelação da reação foi aplicada a solução cromógena Diaminobenzidina 3,3' (DAB, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA), em cada corte por exatos dois minutos, seguido de banho em água destilada. Todos os

espécimes receberam contra coloração com Hematoxilina de Harris. Foi realizada a remoção de pigmento formólico através da rápida imersão das lâminas em solução aquosa de hidróxido de amônia a 1% e lavagem durante dois minutos em água corrente. Procedeu-se então a desidratação em grade crescente de etanol, 85%, 95% e etanol absoluto, diafanização com xilol por 40 min e montagem das lamínulas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Como controle positivo utilizou-se cortes de placenta, em que a imunopositividade para as enzimas foi previamente determinada, e como controle negativo, foi omitido o anticorpo primário da sequência da reação.

2.5 AVALIAÇÃO DA REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

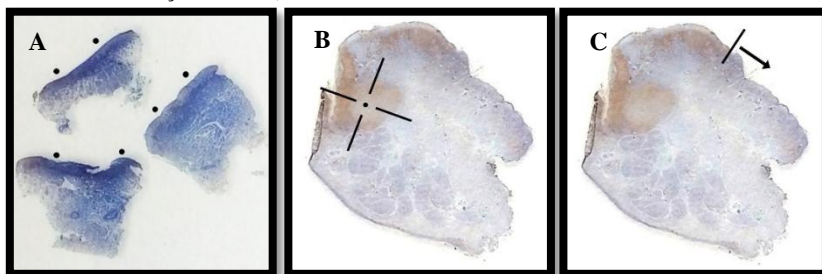
Foi avaliada a imunorreatividade nuclear para HDAC1, HDAC2 e HAT1, nas células epiteliais dos ENNs e das QAs, e células neoplásicas dos CEL. Dentro do grupo dos CEL, foram selecionados 13 casos em que foi possível observar epitélio de revestimento não neoplásico (ERNN) adjacente à área de invasão tumoral, cujas células também foram analisadas.

Foram realizadas fotomicrografias com parâmetros de captura padronizados em, pelo menos, 5 campos equidistantes capturados em magnificação de 400X sob microscópio de luz (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Nos cortes de ENN e QA foram realizadas as capturas a partir da interface epitélio/conjuntivo (Figura 1A), e os cortes de CEL foi realizada uma captura em cada quadrante e uma central (Figura 1B). Nos ERNN foram capturados 6 campos consecutivos, imediatamente adjacentes à área de invasão tumoral, na área exígua de tumor (Figura 1C). A imunopositividade para cada amostra foi expressa em porcentagem de núcleos positivos em relação ao número total de células contadas. Para cada caso, um mínimo de 500 células foram contadas.

Afim de comparar os resultados obtidos, com os dados publicados na literatura, foi estabelecida a sobre-expressão de cada proteína nos grupos de QA e CEL. Tomou-se como parâmetro a média de porcentagem de imunorreatividade do grupo de ENN respectivo de cada proteína, considerando sobre-expressos os casos de QA e CEL em que a porcentagem de expressão excedesse a média de expressão do ENN.

Um único examinador foi previamente submetido a uma calibração na qual foram examinados 30 campos, em 4 momentos, com intervalo de 1 semana, obtendo-se o coeficiente de correlação intraclasse de 0,86. Então realizou-se a contagem de núcleos para cada amostra de ENN, QA, CEL e ERNN, utilizando o *Software ImageJ* versão 1.410 (National Institute of Health, Bethesda, EUA).

Figura 1. Cortes histológicos observados a olho nu, representando a marcação dos espécimes para captura das fotomicrografias. A) Corte de queilite actínica (pontos). B) Corte de carcinoma epidermoide de lábio (divisão em quadrantes e ponto central). C) Corte de carcinoma epidermoide de lábio para captura de Epitélio de revestimento não neoplásico adjacente (a partir do final da área de invasão na direção da seta).



2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O *Software Action* versão 2.3 (Estatcamp, São Carlos-SP, Brasil) foi utilizado para a análise estatística dos dados. Como não houve distribuição normal dos dados, de acordo com o teste de Shapiro-Wilk ($p=0,00000005$ para HDAC1, $p=0,00000003$ para HDAC2, $p=0,00000000006$ para HAT1), utilizaram-se testes estatísticos não paramétricos. Para comparação da incidência de imunopositividade de cada enzima entre os grupos e também para a comparação da imunomarcagem com o grau de displasia epitelial nas QA e com o grau de diferenciação histopatológica nos CEL, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para analisar a possível correlação das proteínas entre si. Foi adotado o nível de significância de 0,05 para os testes estatísticos aplicados. Estimou-se ainda o intervalo de confiança do percentual de imunopositividade para os grupos, considerando 95% de confiança e margem de erro de 5%.

3 ARTIGOS

3.1 ARTIGO DE REVISÃO

*Artigo formatado conforme as normas da revista *Cancer*.

Modificações de histonas: revisão sobre a presença deste fenômeno epigenético na iniciação e progressão do câncer

Emanuely da Silva Chrun¹

Filipe Modolo Siqueira²

Filipe Ivan Daniel²

¹ Aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Mestrado).
Universidade Federal de Santa Catarina

² Dr. Professor do Departamento de Patologia. Universidade Federal de Santa Catarina.

Autor de Correspondência:

*Prof. Dr. Filipe Ivan Daniel,
Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde.
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário
Trindade- Florianópolis-SC, Rua Delfino Conti, s/n, CEP: 88040-370.*

RESUMO

A acetilação de histonas é uma das alterações epigenéticas que tem sido reconhecida como um processo fundamental com fortes efeitos na regulação da transcrição gênica. Alterações nesse fenômeno têm sido associadas à carcinogênese. Nesta revisão, foram analisados estudos que relatam o processo de modificação de histonas, as enzimas relacionadas e os genes afetados que estão sendo associados a cânceres em seres humanos e medicamentos inibidores de histona desacetilases (HDACi) usados para o tratamento do câncer. Vários graus de expressão de HDAC (histona desacetilases) e HAT (histona acetiltransferases) estão sendo encontrados em vários tipos de cânceres e a acetilação de histonas parece influenciar diferentes processos, incluindo a progressão do ciclo celular, a dinâmica de cromossomos, a apoptose, a recombinação e o reparo de DNA. Assim, o controle da atividade e/ou a expressão alteradas dessas proteínas são favoráveis no tratamento de doenças como o câncer. HDACi demonstraram eficácia em ensaios clínicos em tumores sólidos e hematológicos. Portanto, o desenvolvimento e uso

desses inibidores estão aumentando, levando à continuidade dos estudos sobre a expressão e comportamento dessas enzimas com o objetivo de determinar os tumores que irão responder melhor a este tipo de tratamento.

Palavras-chave: Histona Desacetilases, Histona Acetiltransferases, Genes, Câncer, Revisão.

ABSTRACT:

Among the epigenetic changes, histone acetylation has been recognized as a fundamental process that strongly affects gene expression regulation. Disrupt of this phenomenon has been linked to carcinogenesis. In this review, we analyzed studies reporting the process of histone modification, the enzymes associated and affected genes concerning human malignancies and histone enzyme inhibitor drugs (HDACi) used for cancer treatment. Varying degrees of expression of HDACs (histone deacetylases) and HATs (histone acetyltransferases) are found in many human malignant tissues and histone acetylation seems to influence different processes including progression of cell cycle, dynamics of chromosomes, DNA recombination, DNA repair and apoptosis. Thus, the control of aberrant activity and/or expression of these proteins have been favorable in treatment of diseases as cancer. HDACi have shown efficacy in clinical trials in solid and hematological malignancies. Therefore, the development and use of HDACs inhibitors are increasing, leading to continue studying these enzyme expressions and behavior, aiming to determine which tumors will respond better to this type of treatment.

Keywords: Histone Deacetylases, Histone Acetyltransferases, Genes, Cancer, Review.

INTRODUÇÃO

A epigenética é um interessante e relativamente recente campo da biologia, que se refere à regulação da expressão do gene, sem alterações na sequência de nucleotídeos do DNA, sendo herdável durante a divisão celular. Progressos têm sido realizados no conhecimento das modificações epigenéticas em tecidos normais e doentes^{1,2}. Sabe-se que essas modificações são reversíveis e têm um papel chave no desenvolvimento de algumas desordens³. Pesquisas em epigenética têm providenciado novos esclarecimentos sobre alguns tipos de doenças, especialmente o câncer, desordens do

neurodesenvolvimento (Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerose múltipla e epilepsia)⁴ e doenças autoimunes (artrite reumatoide⁵, diabetes mellitus tipo1⁶ e lúpus eritematoso⁷). Além das alterações genéticas já conhecidas, a desregulação epigenética é de grande importância no desenvolvimento de tumores malignos⁸, tornando-se um evidente foco da pesquisa nesse campo^{2,9}.

Os principais tipos de informação epigenética são: a) metilação do DNA, onde ocorre a adição de um grupo metil ao carbono-5 de citosina nas ilhas CpG¹⁰ promovendo o silenciamento do gene, e também envolve a desacetilação de histonas através da interação com complexos correpresores¹¹; b) miRNAs^{12,13}, pequenos RNAs não-codificantes envolvidos na regulação dos processos celulares fundamentais e são cruciais para a transcrição e tradução¹⁴, sua desregulação tem sido relacionada à patogênese de muitos cânceres humanos¹⁵; e c) modificações de histona, caracterizadas principalmente pelas alterações no seu estado de acetilação, também fornecendo acesso ou não de fatores de transcrição às sequências de nucleotídeos¹⁶.

Esta revisão de literatura teve como objetivo analisar estudos que reportaram o processo de modificação de histonas, as enzimas relacionadas e os genes afetados com relação a cânceres em seres humanos, bem como medicamentos inibidores de histona desacetilases já utilizados para o tratamento do câncer.

HISTONAS, MODIFICAÇÕES DE HISTONAS E ENZIMAS RELACIONADAS

Histonas são proteínas que, juntamente ao DNA, formam o nucleossomo composto por um núcleo octamérico de histonas (dois heterodímeros de H2A e H2B junto com dois heterodímeros de H3 e H4), que são envolvidos por duas voltas de 147 pares de bases de DNA¹⁷, enquanto a proteína H1 estabiliza e mantém a estrutura da cromatina¹⁸. Cada histona que forma o octâmero dentro do nucleossomo é rica em caudas de lisina que se estendem para fora e por consequência, a acessibilidade do DNA no nucleossomo é, em parte, controlada por modificações nessas caudas¹⁹.

Histonas podem ser submetidas a várias modificações pós-translacionais como ribosilação, ubiquitinação e sumoilação de lisinas, fosforilação de serinas e treoninas, acetilação ou metilação de lisinas e argininas. Os resíduos de lisina nas caudas de histona têm uma carga positiva, que interage com o grupamento fosfato carregado negativamente no DNA. As modificações covalentes levam a alterações na estrutura da cromatina e, assim, afetam a acessibilidade de fatores de

transcrição para "ler" e/ou copiar a sequência de bases de nucleotídeos; portanto, essas estruturas são dinâmicas e têm capacidade de regular a compactação (heterocromatina) e descompactação (eucromatina) da cromatina¹⁷.

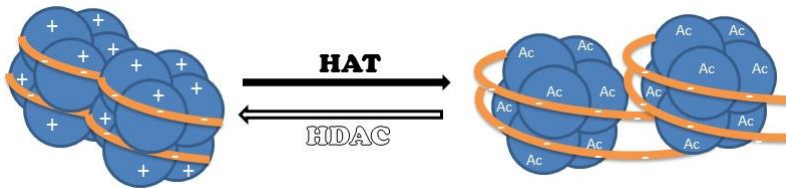


Figura 1. Ação das HATs e HDACs. A acetilação, catalisada pelas HATs, afeta a transcrição através da neutralização das cargas positivas das histonas, enfraquecendo a interação entre DNA e histona ou entre nucleossomos, assim reduzindo a compactação da cromatina e favorecendo a transcrição dos genes. Em oposição, as HDACs promovem a desacetilação, retornando ao estado de compactação da cromatina e silenciamento transcricional.

Histona desacetilases (HDAC) e histona acetiltransferases (HAT) são enzimas que influenciam na transcrição do DNA através do equilíbrio entre a acetilação e a desacetilação no funcionamento normal das células. A acetilação de histonas reduz a compactação da cromatina (Fig. 1): HATs catalisam a transferência de um grupamento acetil (negativamente carregado) de acetil-CoA para as caudas de lisina amino-terminais, neutralizando a carga positiva das histonas (Fig. 2)²⁰. Isso gera um espaço entre DNA-histona e também entre nucleossomos, permitindo acesso dos fatores de transcrição e, portanto, a transcrição do DNA. Por outro lado, a desacetilação de histonas retorna à condensação original: HDACs removem o grupamento acetil devolvendo a carga positiva, permitindo interações entre a carga negativa do DNA e a histona, resultando na condensação da estrutura da cromatina que está associada com a repressão do gene^{9,21}.

Até agora, 18 HDACs humanas foram identificadas e são classificadas dentro de quatro classes²²⁻²⁴. A classe I compreende HDAC1, HDAC2, HDAC3, e HDAC8, localizadas principalmente no núcleo celular^{23,25}; a classe II de HDACs são localizadas tanto no núcleo quanto no citoplasma (HDAC4, 5, 7, e 9) ou apenas no citoplasma (HDAC6 e 10); a classe IV inclui a HDAC11, que aparece tanto no núcleo quanto no citoplasma; enquanto a classe III é composta por

Sirtuínas que, diferente das outras histonas desacetilases, são Zn-dependentes²³.

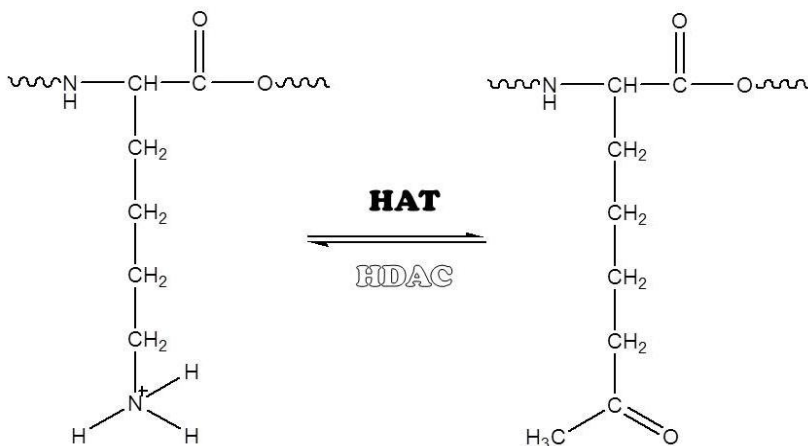


Figura 2. Modificações estruturais da histona mediadas pela HAT e HDAC.

A figura apresenta a lisina da cauda n-terminal das histonas que sofre acetilação (ação da HAT) e desacetilação (ação da HDAC). No pH celular de aproximadamente 7.4, o grupo amina é positivamente carregado. Quando sob ação da HAT, um grupamento acetil é adicionado à essa estrutura e a carga positiva é neutralizada. Por outro lado, quando a HDAC age, o mecanismo oposto ocorre.

A HDAC1 e a HDAC2 são inativas quando produzidas por técnicas recombinantes, sendo que cofatores são necessários para que sua atividade ocorra. *In vivo*, sua atividade é desencadeada apenas dentro de um complexo de proteínas relacionadas com HDACs²⁶. A proteína corressoradora Sin3 é requerida para mediar interações entre proteínas em vários sistemas reguladores da expressão gênica. Como a Sin3 não se liga diretamente ao DNA, promotores são atraídos através de interações com outras proteínas específicas para essa ligação. E, por consequência, requer HDAC como promotora dessas ligações para realizar sua função de repressão. O complexo Mad-Max é bastante incutido durante a diferenciação celular e ação de supressão da proliferação celular se dá através do complexo formado por Sin3/HDAC²⁷ (Fig. 3a). Ume6, Ncor e YY1²⁸ (todos repressores transcricionais) requerem Sin3 que, por sua vez, precisa de HDAC para

se ligar ao DNA. MeCP2 é uma das quatro principais proteínas com um domínio de ligação à metil-CpG capaz de se ligar ao DNA metilado, resultando no silenciamento transcricional, provavelmente devido ao complexo Sin3/HDAC recrutado para efetuar a repressão do gene^{8,29} (Fig. 3b). Assim, HDACs, direta ou indiretamente, são requeridas por esses outros fatores, evidenciando seu papel e importância no silenciamento gênico, mostrando serem fundamentais para os mecanismos reguladores que regem a proliferação e diferenciação celular³⁰.

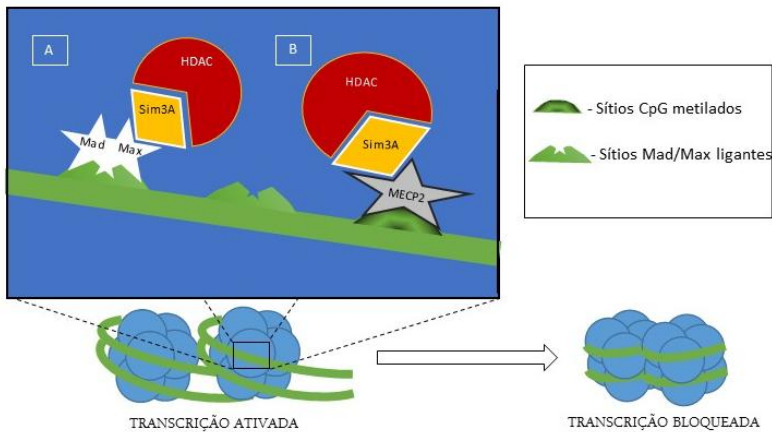


Figura 3. Ilustração de hipóteses de complexos correpressores envolvendo HDACs. (A) Mad-Max requer Sin3A-HDAC para repressão transcricional. (B) Sítios CpG metilados atraem proteínas metil-ligantes como MeCP2 que, por sua vez, atraem Sin3A e HDAC para o silenciamento do mecanismo transcricional

As HATs têm sido organizadas em duas classes gerais (tipo-A e tipo-B) baseando-se na sua provável origem e função nas células. As do Tipo-A, com localização nuclear, provavelmente participam catalisando a acetilação e eventos relacionados com a transcrição do gene. HATs do Tipo-B são, provavelmente, responsáveis pela catalisação de eventos de acetilação relacionados ao transporte de histonas recém-sintetizadas do citoplasma para o núcleo e sua deposição na replicação do DNA. Determinados domínios de HAT contêm sítios ligantes para acetil-CoA e estão presentes na estrutura de todas as proteínas que têm atividade de HAT³¹.

E ainda, baseando-se na sua estrutura primária, as HATs são organizadas dentro de famílias. As quatro famílias de HAT mais estudadas são: GNAT (Gcn5, PCAF, Hat1, Elp3, e Hpa2); p300/CBP

(p300, e CBP); MYST (Esa1, MOF, Sas2, Sas3, MORF, Tip60, e Hbo1), e Rtt109^{31,32}.

Muitas das HATs identificadas até agora não funcionam isoladas *in vivo*, mas assim como as HDACs, frequentemente agem dentro de um complexo coativador. Um estudo *in vitro*, através de teste de imunoprecipitação utilizando anticorpos para reconhecer histonas hiperacetiladas, notou que essas histonas estão geralmente localizadas em regiões de sensibilidade a DNase, que são regiões transcricionalmente ativas, reforçando o papel das HATs na transcrição³¹. Cada HAT exibe locais e histonas específicas. E, para cada função fisiológica distinta, são necessárias histonas e localização determinadas a serem acetiladas. A especificidade torna-se mais ampla dentro dos complexos¹⁷. Alguns dos complexos coativadores mais citados nos estudos são: ADA (Gnc5, Ada2, e Ada3), SAGA (SPT, ADA2B, ADA3, SGF29/STAF36 e GCN5/PCAF)^{33,34}, STAGA (SPT3-TAF9-GCN5³⁵), e ATAC (Ada *Two-A containing*-GCN5, ADA2A, ADA3, e SGF29^{36,37}). GCN5 e PCAF são duas acetiltransferases parálogas do Gcn5 na levedura, que influenciam em diversos processos biológicos pela acetilação de proteínas histonas e não-histonas, a regulação da cromatina e a transcrição gene-específica e que são parte desses complexos de multiproteínas^{36,37}. Dentro dos complexos ADA e SAGA, a atividade de acetilação de Gcn5 está aumentada, modificando a estrutura da cromatina e regulando o mecanismo basal de transcrição³⁸.

Interações diretas entre as enzimas modificadoras de histonas e reguladores transcricionais sequência-específicos são cruciais para alcançar o objetivo, que é a modificação das histonas¹⁷. A desacetilação aberrante de histonas é responsável pela repressão transcricional de genes envolvidos na regulação negativa da diferenciação e proliferação, migração e metástase em tumores malignos humanos³⁹. Os níveis globais de modificação de histonas são preditivos da recorrência do câncer, isso indica que acetilação/desacetilação são eventos regulatórios versáteis que exercem papel chave em vários processos celulares⁴⁰.

HDACs E HATs NO CÂNCER

Embora os eventos de acetilação/desacetilação sejam processos específicos e bem controlados na célula normal, a hipoacetilação das histonas desempenha um papel importante na iniciação do câncer, alterando a expressão de genes e o fenótipo celular⁴¹. Três situações são possíveis para que isso ocorra: sobre-expressão de HDACs e/ou sua

atividade excessiva; diminuição da quantidade e/ou atividade das HATs; e ambas condições concomitantemente⁴². A sequência da ação das enzimas modificadoras de histonas também afeta o mecanismo global das proteínas: uma modificação leva ou inibe a outra. A especificidade enzima-substrato (o resíduo específico de determinada cauda de histona) é importante no recrutamento da enzima no exato momento. Esse fenômeno está associado com distintos estados da cromatina e, como previamente discutido, essas alterações levam a mudanças no processo de transcrição¹⁷.

A expressão de HDACs tem sido investigada em diferentes tipos de câncer por diversos autores. Nesta revisão, foram levantados manuscritos sobre expressão de HDACs (Classe I, II, III e IV) em tecidos cancerosos como boca, mama, estômago, pulmão, próstata, cólon e reto, ovário, endométrio, pâncreas, tireoide, esôfago, leucemia e linfoma (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo dos estudos de expressão de HDACs em cânceres em seres humanos e linhagens de células.

Proteína	Tecido	Amostra	Método	Expressão		Referência
HDAC1	Câncer de Boca	49 pacientes	IHQ	N	↑	Theocharis <i>et al.</i> ⁴³
	Linfoma	91 pacientes	IHQ	N	↓	Lee <i>et al.</i> ⁴⁴
		104 pacientes	IHQ / WB	-	↑	Min <i>et al.</i> ⁹
		283 TMA	IHQ	N	↑	Adams <i>et al.</i> ⁴⁵
	Câncer de mama	200 pacientes	IHQ / RT-PCR	N	Expressão heterogênea	Krusche <i>et al.</i> ⁴⁶
		20 pacientes	IHQ / WB	N	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
		58 pacientes	IHQ	N	↓	Suzuki <i>et al.</i> ⁴²
		8 pacientes/ 2 linhagens de células	IF / WB	-	↑	Ververis & Karagiannis ⁴⁸
		238 / 300 pacientes	IHQ	N	Expressão heterogênea	Muller <i>et al.</i> ⁴⁹ / Seo <i>et al.</i> ⁵⁰
	Leucemia	94 pacientes	qRT-PCR	-	Expressão heterogênea	Moreno <i>et al.</i> ⁵¹
		93 pacientes	qRT-PCR / WB	N	↑	Gruhn <i>et al.</i> ⁵²

		39 pacientes / 24 linhagens de células	qRT-PCR	-	↑	Yang <i>et al.</i> ⁵³
	Câncer de estômago	25 pacientes	WB/RT- PCR	N (principal)	↑	Choi <i>et al.</i> ⁵⁴
		20 pacientes	IHQ / WB	N	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
	Câncer de pulmão	102 pacientes	IHQ / RT- PCR	N	↑	Sasaki <i>et al.</i> ⁵⁵
		20 pacientes	IHQ / WB	N	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
	Câncer de próstata	28 pacientes	IHQ / RT- PCR	-	↑	Patra, Patra & Dahiya ⁵⁶
		14 pacientes	IHQ / FC / IF / WB	N	↑	Halkidou <i>et al.</i> ⁵⁷
		20 pacientes	IHQ / WB	N	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
		192 pacientes	IHQ	N	↑	Weichert <i>et al.</i> ⁵⁸
	Câncer colorretal	64 pacientes	IHQ	N	↑	Ishihama <i>et al.</i> ⁵⁹
		20 pacientes	IHQ / WB	N	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
	Câncer de ovário	20 pacientes	IHQ / WB	N	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
		115 pacientes	IHQ	N	↑	Hayashi <i>et al.</i> ⁶⁰
	Câncer de endométrio	17 pacientes	IHQ	N	↓	Krusche <i>et al.</i> ⁶¹
	Câncer pancreático	20 pacientes	IHQ / WB	N	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
	Câncer de tireoide	20 pacientes	IHQ / WB	N	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
		74 pacientes	IHQ	N/C	↑	Giaginis <i>et al.</i> ²²
	Câncer de esôfago	20 pacientes	IHQ / WB	N	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
HDAC2	Câncer de boca	93 pacientes	IHQ	N (principal)	↑	Chang <i>et al.</i> ⁶²
		49 pacientes	IHQ	N	↑	Theocharis <i>et al.</i> ⁴³
	Linfoma	283 / 91 pacientes	IHQ	N	↑	Adams <i>et al.</i> ⁴⁵ / Lee <i>et al.</i> ⁴⁴
		104 pacientes	IHQ / WB	-	↑	Min <i>et al.</i> ⁹

	Câncer de mama	20 pacientes	IHQ / WB	N	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
		58 pacientes	IHQ	N	↓	Suzuki <i>et al.</i> ⁴²
		8 pacientes / 2 linhagens de células	IF / WB	N	↑	Ververis & Karagiannis ⁴⁸
		238 / 300 pacientes	IHQ	N	Expressão heterogênea	Muller <i>et al.</i> ⁴⁹ / Seo <i>et al.</i> ⁵⁰
	Leucemia	94 pacientes	qRT-PCR	-	↑	Moreno <i>et al.</i> ⁵¹
		39 pacientes / 24 linhagens de células				Yang <i>et al.</i> ⁵³
		93 pacientes	qRT-PCR / WB	-	↑	Gruhn <i>et al.</i> ⁵²
	Câncer de estomago	71 pacientes	IHQ	N	↑	Song <i>et al.</i> ⁶³
		20 pacientes	IHQ / WB	N	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
	Câncer de pulmão	20 pacientes	IHQ / WB	N	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
	Câncer de próstata	20 pacientes	IHQ / WB	N	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
		192 pacientes	IHQ	N	↑	Weichert <i>et al.</i> ⁵⁸
	Câncer colorretal, ovário, pancreático, de tireoide e de esôfago	20 pacientes	IHQ / WB	N	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
HDAC3	Linfoma	283 TMA	IHQ	N	↑	Adams <i>et al.</i> ⁴⁵
		104 pacientes	IHQ / WB	-	↑	Min <i>et al.</i> ⁹
	Câncer de mama	20 pacientes	IHQ / WB	N/C	↓	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
		8 pacientes / 2 linhagens de células	IF / WB	N	↑	Ververis & Karagiannis ⁴⁸
		238 pacientes	IHQ	N	Expressão heterogênea	Muller <i>et al.</i> ⁴⁹
		300 pacientes	IHQ	N/C	Expressão heterogênea	Seo <i>et al.</i> ⁵⁰

	Leucemia	94 pacientes 39 pacientes / 24 linhagens de células	qRT-PCR	-	↑	Moreno <i>et al.</i> ⁵¹ Yang <i>et al.</i> ⁵³
	Câncer de pulmão	20 pacientes	IHQ / WB	N	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
	Câncer de próstata	20 pacientes	IHQ / WB	N	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
		192 pacientes	IHQ	N	↑	Weichert <i>et al.</i> ⁵⁸
	Câncer colorretal, ovariano, pancreático, de tireoide e de esôfago	20 pacientes	IHQ / WB	N	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
HDAC4	Linfoma	91 pacientes	IHQ	N/C	↑	Lee <i>et al.</i> ⁴⁴
	Câncer de mama	8 pacientes / 2 linhagens de células	IF / WB	C	↓	Ververis & Karagiannis ⁴⁸
	Leucemia	94 pacientes	qRT-PCR	-	Expressão heterogênea	Moreno <i>et al.</i> ⁵¹
		93 pacientes	qRT-PCR / WB	-	↑	Gruhn <i>et al.</i> ⁵²
		39 pacientes / 24 linhagens de células	qRT-PCR	-	↑	Yang <i>et al.</i> ⁵³
HDAC5	Linfoma	91 pacientes	IHQ	N/C	↑	Lee <i>et al.</i> ⁴⁴
	Câncer de mama	8 pacientes / 2 linhagens de células	IF / WB	N/C	↓	Ververis & Karagiannis ⁴⁸
	Leucemia	94 pacientes	qRT-PCR	-	Expressão heterogênea	Moreno <i>et al.</i> ⁵¹
		39 pacientes / 24 linhagens de células	qRT-PCR	-	↑	Yang <i>et al.</i> ⁵³
HDAC6	Câncer de boca	9 pacientes	IHQ / IF / WB / qRT-PCR	C	↑	Sakuma <i>et al.</i> ⁶⁴
	Linfoma	91 pacientes	IHQ	N/C	↑	Lee <i>et al.</i> ⁴⁴
	Câncer de	58 pacientes	IHQ	C	↑	Suzuki <i>et</i>

	mama					<i>al.</i> ⁴²
		8 pacientes / 2 linhagens de células	IF / WB	-	↑	Ververis & Karagiannis ⁴⁸
		300 pacientes	IHQ	C	Expressão heterogênea	Seo <i>et al.</i> ⁵⁰
	Leucemia	94 pacientes	qRT-PCR	-	↑	Moreno <i>et al.</i> ⁵¹
		39 pacientes / 24 linhagens de células				Yang <i>et al.</i> ⁵³
HDAC7	Câncer de mama	8 pacientes 2 linhagens de células	IF / WB	N	↓	Ververis & Karagiannis ⁴⁸
	Leucemia	94 pacientes	qRT-PCR	-	↑	Moreno <i>et al.</i> ⁵¹
HDAC8	Câncer de mama	20 pacientes	IHQ / WB	N/C	↓	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
		8 pacientes / 2 linhagens de células	IF / WB	N	↑	Ververis & Karagiannis ⁴⁸
	Leucemia	94 pacientes	qRT-PCR	-	↑	Moreno <i>et al.</i> ⁵¹
		39 pacientes / 24 linhagens de células				Yang <i>et al.</i> ⁵³
		93 pacientes	RT-PCR / WB	-	↑	Gruhn <i>et al.</i> ⁵²
	Câncer de estômago, de pulmão, de próstata, colorretal, ovariano, pancreático, de tireoide e de esôfago	20 pacientes	IHQ / WB	N/C	↑	Nakagawa <i>et al.</i> ⁴⁷
HDAC9	Câncer de mama	8 pacientes / 2 linhagens de células	IF / WB / WB	N/C	↓	Ververis & Karagiannis ⁴⁸
	Leucemia	94 pacientes	qRT-PCR	-	Expressão heterogênea	Moreno <i>et al.</i> ⁵¹

		39 pacientes / 24 linhagens de células	qRT-PCR	-	↑	Yang <i>et al.</i> ⁵³
HDAC10	Câncer de mama	8 pacientes / 2 linhagens de células	IF / WB	C	↑	Ververis & Karagiannis ⁴⁸
	Leucemia	94 pacientes	qRT-PCR	-	Expressão heterogênea	Moreno <i>et al.</i> ⁵¹
		39 pacientes / 24 linhagens de células	qRT-PCR	-	↑	Yang <i>et al.</i> ⁵³
HDAC11	Câncer de mama	8 pacientes / 2 linhagens de células	IF / WB	-	↓	Ververis & Karagiannis ⁴⁸
	Leucemia	94 pacientes	qRT-PCR	-	Expressão heterogênea	Moreno <i>et al.</i> ⁵¹
		93 pacientes	qRT-PCR / WB	-	↑	Gruhn <i>et al.</i> ⁵²

TMA: microarranjos teciduais; IHQ: imuno-histoquímica; WB: Western-Blot; RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa; IF: imunofluorescência; qRT-PCR: RT-PCR em tempo real; FC: citometria de fluxo; N: nuclear; C: citoplasmática; N/C: nuclear e citoplasmática; ↑: expressão aumentada; ↓: expressão diminuída.

HDAC1 e HDAC2 são as desacetilases mais estudadas e bem compreendidas em cânceres humanos e linhagens celulares, com marcação predominantemente nuclear quando conduzida a imuno-histoquímica^{42-47,49,55,57-62}. Apesar do aumento de expressão ser encontrado na maioria das investigações, alguns tumores (câncer de mama^{46,49,50} e leucemia⁵¹) mostraram expressão inconstante ou variável. O câncer de mama e a leucemia são os mais investigados pela maioria dos autores. O câncer de mama mostra ampla variação de expressão de HDAC1, HDAC2 e HDAC3^{46,49,50}, enquanto essas proteínas estão sobre-expressas em outros cânceres investigados. Os relatos quanto à leucemia mostram expressão aumentada para a maioria dos estudos⁵¹⁻⁵³. Outros autores encontraram expressão heterogênea dentro de vários subtipos de cânceres hematológicos.

A expressão anormal de HDACs e HATs pode causar alterações epigenéticas associadas ao comportamento maligno das células e tem sido associada com o desenvolvimento e progressão tumoral^{22,58,65}. A acetilação e desacetilação de histonas afeta a expressão de vários genes envolvidos na carcinogênese. As HDACs podem reprimir a transcrição de fatores de diferenciação permitindo a proliferação celular sem

diferenciação, de inibidores de quinase dependentes de ciclina e de fatores pró-apoptóticos bloqueando a morte celular programada. Essa repressão promove o crescimento celular desordenado observado na iniciação e progressão de tumores malignos³⁹. Todos esses eventos podem ser suportados pela evidência de estudos que utilizam inibidores de HDAC (HDACi) (Tabela 2).

Tabela 2. Exemplos de genes provavelmente silenciados pelas HDACs e inibidores utilizados para a re-expressão dos genes.

Gene	Linhagens de células cancerosas	Proteína alvo	Inibidor	Referência
p21	Cólon	HDAC1 / HDAC2	-	Huang <i>et al.</i> ⁶⁶
	Pulmão, estômago, cólon	HDAC1 / HDAC2	TSA / VPA / Butirato	Lin <i>et al.</i> ⁶⁷
	Pulmão	-	Depsipeptídeo / TSA	Zhao ⁶⁸
	Endométrio	HDAC2	Valproato	Hrzenjak <i>et al.</i> ⁶⁹
APC	Cólon	HDAC2	VPA	Zhu <i>et al.</i> ⁷⁰
	Cólon	-	SFN	Myzak <i>et al.</i> ⁷¹
DAB2	Ovário	HDAC1 / HDAC2	TSA	Caslini <i>et al.</i> ⁷²
GATA4	Ovário	HDAC1 / HDAC2	TSA	Caslini <i>et al.</i> ⁷²
GATA6	Ovário	HDAC1 / HDAC2	TSA	Caslini <i>et al.</i> ⁷²
MUC2	Pâncreas	-	TSA	Yamada <i>et al.</i> ⁷³
RI	Mama	-	SAHA	Ammanamanchi e Brattain ⁷⁴
p53	Pulmão	HDAC1	TSA	Kim <i>et al.</i> ⁴¹
E-cadherin	Pâncreas	HDAC1 / HDAC2	TSA VPA	Von Burstin <i>et al.</i> ⁷⁵
	Nasofaríngeo	HDAC1 / HDAC2	-	Tong <i>et al.</i> ⁷⁶
	Ovário	HDAC1 / HDAC3	TSA / Apicidin / SAHA	Hayashi <i>et al.</i> ⁶⁰
DTWD1	Estômago	HDAC3	TSA	Ma <i>et al.</i> ⁷⁷
PUMA	Estômago	HDAC3	TSA	Feng <i>et al.</i> ⁷⁸
5-HTT	Fígado, linfoma, Tumor mielomonocítico	HDAC1	TSA	Phi Van <i>et al.</i> ⁷⁹

TSA: tricostatin A; VPA: ácido valpróico; SFN: sulforafane; SAHA: ácido hidroxâmico suberoilanolida.

A função das proteínas modificadoras de histonas no câncer está baseada na seguinte explicação: quando ocorre sobre-expressão de HDACs, provavelmente atividades de genes supressores tumorais, como

o p21 (inibidor de progressão do ciclo celular) são silenciados levando à iniciação e/ou progressão tumoral, assim como outros experimentos mostram que a desacetilação de p53 pelas HDACs, provavelmente, participam do mecanismo que controla a atividade fisiológica da p53 e depende da região da p53 acetilada pela p300/CBP (HAT) ⁸⁰. Também tem sido sugerido que a perda de expressão de HDAC, junto com a falta de controle na expressão de oncogenes, pode ajudar na carcinogênese dependendo do complexo correpessor a que está ligado, por exemplo, a expressão de Rb requer HDAC1 para reprimir a transcrição e exercer seu papel na supressão tumoral ^{81,82}, o mesmo ocorre com AML1-ETO (frequentemente alterado em leucemias) ⁸³.

Além de mudanças na expressão de HDAC em diversos tipos de câncer, translocações, mutações e deleções em HAT e genes relacionados a HAT podem também contribuir com o desequilíbrio global da acetilação de histonas². Com a acetilação, sugere-se que a acetil-lisina da cauda das histonas possibilita o reconhecimento dos sítios ligantes pelos fatores envolvidos na transcrição do gene⁸⁴. O papel de vários tipos de HAT dentro dos tumores malignos é objeto de extensiva discussão, há evidências de sua ação colaborando com a expressão de genes supressores tumorais clássicos e, por outro lado, ativando oncogenes, dependendo do gene alvo avaliado (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo do envolvimento das HATs mais estudadas e seus genes alvo no câncer.

Família de HAT	HAT	Gene	Favorecendo a oncogênese	Favorecendo a supressão tumoral	Referência
GNAT	GCN5	E2F1, ciclina D1 e ciclina E1	Câncer de pulmão	-	Chen <i>et al.</i> ⁸⁵
		KLF4	-	Carcinoma epidermoide de esôfago	Hu <i>et al.</i> ⁸⁶
p300/CBP	p300	p53	-	Glioma, câncer de ovário, mama, colorretal, pulmão e pâncreas	Gayther <i>et al.</i> ⁸⁷
		Ciclina E	Melanoma	-	Bandyopadhyay <i>et al.</i> ⁸⁸
		Rb	-	Câncer de colon e	Iyer <i>et al.</i> ⁸⁹

				cervical	
		MYC	Câncer de pulmão e hematopoietico	-	Ogiwara <i>et al.</i> ⁹⁰
MYST	Tip60	Rb	-	Câncer de pulmão	Leduc <i>et al.</i> ⁹¹
		P53	-	Câncer de pele	Hobbs <i>et al.</i> ⁹²
		AR	Câncer de próstata	-	Gaughan <i>et al.</i> , 2002 ⁹⁶ , Halkidou <i>et al.</i> ^{93,94}
		c-Myc	Leucemia de células-T/ Linfoma	-	Awasthi ⁹⁵
		NF-κB		Metástase	Kim <i>et al.</i> ⁹⁶
	HBO1	AR	Câncer de próstata	-	Sharma <i>et al.</i> ⁹⁷
		NF-κB	-	Leucemia	Contzler <i>et al.</i> ⁹⁸
		VHL	-	Câncer renal	Zhou <i>et al.</i> ⁹⁹
	MOZ	Nrf2	Câncer de fígado	-	Ohta <i>et al.</i> ¹⁰⁰
		AML-1	-	Leucemia	Katsumoto <i>et al.</i> ¹⁰¹

INIBIDORES DE HDAC (HDACi)

HDACi são um grupo de medicamentos com diferentes estruturas, atividades biológicas e especificidade que mostram ser potentes agentes antiproliferativos, com relativamente pequeno efeito nos tecidos normais sendo clinicamente bem tolerados^{102,103}. Essas drogas, em geral, exercem sua atividade anticancerígena pelo favorecimento da acetilação, revertendo o excesso de histonas desacetiladas, levando à re-expressão de genes silenciados, o que contribui para reverter o fenótipo maligno¹⁰⁴.

Os efeitos dos HDACi na transcrição são complexos. Entre suas propriedades estão a parada do ciclo celular, a geração de espécies reativas de oxigênio, indução à apoptose e efeitos antiangiogênicos. Essa cascata de modificações na expressão dos genes ocorre devido a acetilação de histonas¹⁰⁴ e proteínas nucleossomais não-histonas¹⁰⁵. Os efeitos na acetilação de proteínas não-histonas podem afetar muitos processos regulatórios vitais, incluindo a ativação da transcrição, retomando a produção de proteínas (por exemplo p53, p21 e tubulina)¹⁰³. Outro efeito importante é que os HDACi também agem nos *checkpoints* do ciclo celular, permitindo maior especificidade para

células tumorais, tendo em vista que os *checkpoints* são frequentemente defeituosos nas células cancerosas¹⁰⁶.

Essencialmente formados por um domínio zinco-ligante, um grupo terminal e uma cadeia de ligação entre eles, os HDACi sintéticos são classificados de acordo com suas diferentes estruturas químicas em quatro principais classes¹⁰⁷:

- Ácidos Hidroxâmicos (relacionados ao tricostatin A [TSA], que é produzido naturalmente por *Streptomyces hygroscopicus*): vorinostat (SAHA), belinostat, abexinostat, pracinostat, resminostat, givinostat, panobinostat e CUDC-101;
- Derivados de Benzamida: mocetinostat, entinostat e tacedinaline
- Ácidos graxos de cadeia curta (relacionados ao Butirato de sódio): ácido valpróico e fenilbutirato
- Peptídeos Cíclicos: romidepsin

HDACi vem sendo testados em tumores sólidos e hematológicos apresentando bons resultados. O estudo de Haberland *et al.* (2009)¹⁰⁸ mostrou que a administração sistêmica de HDACi, pode inibir a maioria, ou todas, as HDACS ubiquamente expressas, são bem tolerados *in vivo* e agem sobre numerosas doenças associadas a programação da expressão gênica de uma forma, aparentemente, específica. Assim, inesperadamente, células normais são, na maioria das vezes, menos sensíveis aos HDACi do que as células cancerosas¹⁰⁸, o que é muito positivo em se tratando da terapia antineoplásica. O uso de inibidores tem sido clinicamente validado e aprovado em pacientes com câncer pela FDA (*Food and Drug Administration*, EUA). Além disso, ensaios clínicos de vários HDACi para o uso como drogas antineoplásicas sozinhas ou em combinação com outros agentes terapêuticos estão em andamento (Tabela 4).

Tabela 4. Inibidores de HDAC aprovados pela FDA e pesquisas envolvendo esses medicamentos.

HDACi	Classe	Ano de aprovação	Associação	Tumor alvo	Referência
Vorinostat (SAHA, Zolina)	Ácido Hidroxâmico	2006	-	Linfoma cutâneo de células-T	Mann <i>et al.</i> ¹⁰⁹
		Em pesquisa	-	Neoplasias hematológicas	Kelly <i>et al.</i> ¹¹⁰
			Temozolomida e radioterapia	Glioblastoma	Shi <i>et al.</i> ¹¹¹

			-	Endométrio	Bokhman ¹¹² ; Lax ¹¹³ ; Sarfststein <i>et al.</i> ¹¹⁴
			Hipóxia e radioterapia	Pulmão	Ma <i>et al.</i> ¹¹⁵
			-	Gastrointestinal	Saelen <i>et al.</i> ¹¹⁶
Romidepsin (Istodax, FK228, FR901228, depsipeptídeos)	Peptídeos Cíclicos	2009	-	Linfoma cutâneo de células-T	Piekarz <i>et al.</i> ¹¹⁷ ; Whittaker <i>et al.</i> ¹¹⁸
		2011	-	Linfoma periférico de células-T	Coiffier <i>et al.</i> ¹¹⁹
		Em pesquisa	Bortezomib	Pulmão	Karthik <i>et al.</i> ¹²⁰
			-	Câncer de Mama metastático	Robertson <i>et al.</i> ¹²¹
			Gencitabina	Pâncreas, mama, pulmão e ovário	Jones <i>et al.</i> ¹²²
			-	Tireoide	Amiri- Kordestani <i>et al.</i> ¹²³
Belinostat (Beleodaq, PXD-101)	Ácido Hidroxiâmico	2014	-	Linfoma periférico de células-T	Poole ¹²⁴
		Em pesquisa	-	Mesotelioma pleural maligno	Ramalingam <i>et al.</i> ¹²⁵
			-	Ovário	Mackay <i>et al.</i> ¹²⁶
			-	Carcinoma do Timo	Giaccone <i>et al.</i> ¹²⁷
			-	Síndrome Mielodisplásica	Cashen <i>et al.</i> ¹²⁸
			Carboplatina e paclitaxel	Ovário	Dizon, Blessing, <i>et al.</i> ¹²⁹ ; Dizon, Damstrup, <i>et al.</i> ¹³⁰
			-	Leucemia mieloide aguda	Kirschbaum <i>et al.</i> ¹³¹
			Cisplatina, doxorubicina, ciclofosfamida	Carcinoma do Timo	Thomas <i>et al.</i> ¹³²
			-	Fígado	Ma <i>et al.</i> ¹³³
			-	Leucemia promielocítica aguda	Savickiene <i>et al.</i> ¹³⁴

HATs e HDACs são reconhecidas como fundamentais no processo que afeta fortemente a regulação da expressão dos genes. Os estudos estruturais e funcionais têm embasado tentativas de elucidar as características moleculares, mecanismos e regulação dessas enzimas. Esses esforços são cruciais para o desenvolvimento dessas terapias que têm como alvo as enzimas modificadoras de histonas dentro do seu complexo específico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos estudos têm reportado diferentes graus de expressão de HDACs e HATs em muitas neoplasias malignas humanas e há evidências de que os substratos dessas proteínas não estão limitados às histonas, promovendo uma cascata de modificações com sua desregulação. Visto que a função exata das HATs e HDACs não está esclarecida, incluindo o equilíbrio adequado entre elas, estudos futuros poderão esclarecer a função destas proteínas, melhorando as estratégias terapêuticas em conjunto com terapias existentes. Embora HDACi tenham demonstrado eficácia em ensaios clínicos em tumores malignos sólidos e hematológicos, alguns autores sugerem que o uso de HDACi deve ser dirigido para casos que expressam fortemente HDACs nas células do tumor. Apesar destas divergências, o desenvolvimento e o uso de inibidores de HDAC estão aumentando, o que leva a continuar estudando a expressão dessas enzimas e seu comportamento, com o objetivo de determinar os tumores que irão responder melhor a este tipo de tratamento.

REFERÊNCIAS

- 1 Feinberg, A. P. & Tycko, B. The history of cancer epigenetics. (2004). *Nat Rev Cancer* 4, 143-153.
- 2 Portela, A. & Esteller, M. Epigenetic modifications and human disease. (2010). *Nat Biotechnol* 28, 1057-1068.
- 3 Yoo, C. B. & Jones, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. (2006). *Nat Rev Drug Discov* 5, 37-50.
- 4 Urdinguio, R. G., Sanchez-Mut, J. V. & Esteller, M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. (2009). *Lancet Neurol* 8, 1056-1072.
- 5 Karouzakis, E., Gay, R. E., Gay, S. & Neidhart, M. Epigenetic control in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. (2009). *Nat Rev Rheumatol* 5, 266-272.
- 6 Miao, F. *et al.* Lymphocytes from patients with type 1 diabetes display a distinct profile of chromatin histone H3 lysine 9

- dimethylation: an epigenetic study in diabetes. (2008). *Diabetes* 57, 3189-3198.
- 7 Javierre, B. M. *et al.* Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. (2010). *Genome Res* 20, 170-179.
 - 8 Daniel, F. I., Cherubini, K., Yurgel, L. S., de Figueiredo, M. A. & Salum, F. G. The role of epigenetic transcription repression and DNA methyltransferases in cancer. (2011). *Cancer* 117, 677-687.
 - 9 Min, S. K. *et al.* Expression of HAT1 and HDAC1, 2, 3 in Diffuse Large B-Cell Lymphomas, Peripheral T-Cell Lymphomas, and NK/T-Cell Lymphomas. (2012). *Korean J Pathol* 46, 142-150.
 - 10 Cheng, X. & Blumenthal, R. M. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. (2008). *Structure* 16, 341-350.
 - 11 Ng, H. H. & Bird, A. DNA methylation and chromatin modification. (1999). *Curr Opin Genet Dev* 9, 158-163
 - 12 Kanwal, R. *et al.* Epigenetic modifications in cancer. (2014). *Clinical Genetics* 81, 303-311.
 - 13 Kuo, C. H. *et al.* Epigenetic regulation in allergic diseases and related studies. (2014). *Asia Pac Allergy* 4, 14-18.
 - 14 Gotte, M. MicroRNAs in breast cancer pathogenesis. (2010). *Minerva Ginecol* 62, 559-571.
 - 15 Khoshnaw, S. M., Green, A. R., Powe, D. G. & Ellis, I. O. MicroRNA involvement in the pathogenesis and management of breast cancer. (2009). *J Clin Pathol* 62, 422-428.
 - 16 Cress, W. D. & Seto, E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. (2000). *J Cell Physiol* 184, 1-16.
 - 17 Peterson, C. L. & Laniel, M. A. Histones and histone modifications. (2004). *Curr Biol* 14, R546-551.
 - 18 Izzo, A., Kamieniarz, K. & Schneider, R. The histone H1 family: specific members, specific functions? (2008). *Biol Chem* 389, 333-343.
 - 19 Skene, P. J. & Henikoff, S. Histone variants in pluripotency and disease. (2013). *Development* 140, 2513-2524.
 - 20 Carrozza, M. J., Utley, R. T., Workman, J. L. & Cote, J. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. (2003). *Trends Genet* 19, 321-329.
 - 21 Marks, P. *et al.* Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. (2001). *Nat Rev Cancer* 1, 194-202.

- 22 Giaginis, C. *et al.* Clinical significance of histone deacetylase (HDAC)-1, HDAC-2, HDAC-4, and HDAC-6 expression in human malignant and benign thyroid lesions. (2014). *Tumour Biol* 35, 61-71.
- 23 Lane, A. A. & Chabner, B. A. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. (2009). *J Clin Oncol* 27, 5459-5468.
- 24 Scheipl, S. *et al.* Histone deacetylase inhibitors as potential therapeutic approaches for chordoma: an immunohistochemical and functional analysis. (2013). *J Orthop Res* 31, 1999-2005.
- 25 Gregoret, I. V., Lee, Y. M. & Goodson, H. V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. (2004). *J Mol Biol* 338, 17-31.
- 26 de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. & van Kuilenburg, A. B. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. (2003). *Biochem J* 370, 737-749.
- 27 Hassig, C. A., Fleischer, T. C., Billin, A. N., Schreiber, S. L. & Ayer, D. E. Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation: HATs off to HDACs. (1997). *Cell* 89, 341-347.
- 28 Laherty, C. D. *et al.* Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. (1997). *Cell* 89, 349-356.
- 29 Bird, A. P. & Wolffe, A. P. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. (1999). *Cell* 99, 451-454.
- 30 Grigat, M. *et al.* Multiple histone deacetylases are recruited by corepressor Sin3 and contribute to gene repression mediated by Opi1 regulator of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. (2012). *Mol Genet Genomics* 287, 461-472.
- 31 Roth, S. Y., Denu, J. M. & Allis, C. D. Histone acetyltransferases. (2001). *Annu Rev Biochem* 70, 81-120.
- 32 Dekker, F. J. & Haisma, H. J. in *Drug Discov Today* Vol. 14 942-948 (2009).
- 33 Grant, P. A. *et al.* Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. (1999). *J Biol Chem* 274, 5895-5900.
- 34 Moraga, F. & Aquea, F. Composition of the SAGA complex in plants and its role in controlling gene expression in response to abiotic stresses. (2015). *Front Plant Sci* 6, 865.

- 35 Zhang, N. *et al.* MYC interacts with the human STAGA
coactivator complex via multivalent contacts with the GCN5
and TRRAP subunits. (2014). *Biochim Biophys Acta* 1839, 395-
405.
- 36 Wang, Y. L., Faiola, F., Xu, M., Pan, S. & Martinez, E. Human
ATAC Is a GCN5/PCAF-containing acetylase complex with a
novel NC2-like histone fold module that interacts with the
TATA-binding protein. (2008). *J Biol Chem* 283, 33808-33815.
- 37 Krebs, A. R., Karmodiya, K., Lindahl-Allen, M., Struhl, K. &
Tora, L. SAGA and ATAC histone acetyl transferase
complexes regulate distinct sets of genes and ATAC defines a
class of p300-independent enhancers. (2011). *Mol Cell* 44, 410-
423.
- 38 Riss, A. *et al.* Subunits of ADA-Two-A-Containing (ATAC) or
Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase (SAGA) Coactivator
Complexes Enhance the Acetyltransferase Activity of GCN5.
(2015). *J Biol Chem*.
- 39 Glazak, M. A. & Seto, E. Histone deacetylases and cancer.
(2007). *Oncogene* 26, 5420-5432.
- 40 Seligson, D. B. *et al.* Global histone modification patterns
predict risk of prostate cancer recurrence. (2005). *Nature* 435,
1262-1266.
- 41 Kim, M. S. *et al.* Histone deacetylases induce angiogenesis by
negative regulation of tumor suppressor genes. (2001). *Nat Med*
7, 437-443.
- 42 Suzuki, J. *et al.* Protein acetylation and histone deacetylase
expression associated with malignant breast cancer progression.
(2009). *Clin Cancer Res* 15, 3163-3171.
- 43 Theocharis, S. *et al.* Histone deacetylase-1 and -2 expression in
mobile tongue squamous cell carcinoma: associations with
clinicopathological parameters and patients survival. (2011). *J*
Oral Pathol Med 40, 706-714.
- 44 Lee, S. H. *et al.* Expression of Histone Deacetylases in Diffuse
Large B-cell Lymphoma and Its Clinical Significance. (2014).
Int J Med Sci 11, 994-1000.
- 45 Adams, H., Fritzsche, F. R., Dirnhofer, S., Kristiansen, G. &
Tzankov, A. Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly
expressed in classical Hodgkin's lymphoma. (2010). *Expert*
Opin Ther Targets 14, 577-584.

- 46 Krusche, C. A. *et al.* Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis. (2005). *Breast Cancer Res Treat* 90, 15-23.
- 47 Nakagawa, M. *et al.* Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. (2007). *Oncol Rep* 18, 769-774.
- 48 Ververis, K. & Karagiannis, T. C. An atlas of histone deacetylase expression in breast cancer: fluorescence methodology for comparative semi-quantitative analysis. (2012). *Am J Transl Res* 4, 24-43.
- 49 Muller, B. M. *et al.* Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer--overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. (2013). *BMC Cancer* 13, 215.
- 50 Seo, J. *et al.* Expression of Histone Deacetylases HDAC1, HDAC2, HDAC3, and HDAC6 in Invasive Ductal Carcinomas of the Breast. (2014). *J Breast Cancer* 17, 323-331.
- 51 Moreno, D. A. *et al.* Differential expression of HDAC3, HDAC7 and HDAC9 is associated with prognosis and survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. (2010). *Br J Haematol* 150, 665-673.
- 52 Gruhn, B. *et al.* The expression of histone deacetylase 4 is associated with prednisone poor-response in childhood acute lymphoblastic leukemia. (2013). *Leuk Res* 37, 1200-1207.
- 53 Yang, H. *et al.* Analysis of class I and II histone deacetylase gene expression in human leukemia. (2015). *Leuk Lymphoma*, 1-8.
- 54 Choi, J. H. *et al.* Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. (2001). *Jpn J Cancer Res* 92, 1300-1304.
- 55 Sasaki, H. *et al.* Histone deacetylase 1 mRNA expression in lung cancer. (2004). *Lung Cancer* 46, 171-178.
- 56 Patra, S. K., Patra, A. & Dahiya, R. Histone deacetylase and DNA methyltransferase in human prostate cancer. (2001). *Biochem Biophys Res Commun* 287, 705-713.
- 57 Halkidou, K. *et al.* Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. (2004). *Prostate* 59, 177-189.
- 58 Weichert, W. *et al.* Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is

- associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. (2008). *Br J Cancer* 98, 604-610.
- 59 Ishihama, K. *et al.* Expression of HDAC1 and CBP/p300 in human colorectal carcinomas. (2007). *J Clin Pathol* 60, 1205-1210.
- 60 Hayashi, A. *et al.* Type-specific roles of histone deacetylase (HDAC) overexpression in ovarian carcinoma: HDAC1 enhances cell proliferation and HDAC3 stimulates cell migration with downregulation of E-cadherin. (2010). *Int J Cancer* 127, 1332-1346.
- 61 Krusche, C. A. *et al.* Class I histone deacetylase expression in the human cyclic endometrium and endometrial adenocarcinomas. (2007). *Hum Reprod* 22, 2956-2966.
- 62 Chang, H. H. *et al.* Histone deacetylase 2 expression predicts poorer prognosis in oral cancer patients. (2009). *Oral Oncol* 45, 610-4.
- 63 Song, J. *et al.* Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. (2005). *Apmis* 113, 264-268.
- 64 Sakuma, T. *et al.* Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma. (2006). *Int J Oncol* 29, 117-124.
- 65 Weichert, W. HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. (2009). *Cancer Lett* 280, 168-176.
- 66 Huang, B. H. *et al.* Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. (2005). *Cell Death Differ* 12, 395-404.
- 67 Lin, Y. C. *et al.* Statins increase p21 through inhibition of histone deacetylase activity and release of promoter-associated HDAC1/2. (2008). *Cancer Res* 68, 2375-2383.
- 68 Zhao, Y. *et al.* Acetylation of p53 at lysine 373/382 by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide induces expression of p21(Waf1/Cip1). (2006). *Mol Cell Biol* 26, 2782-2790.
- 69 Hrzenjak, A. *et al.* Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. (2006). *Mol Cancer Ther* 5, 2203-2210.
- 70 Zhu, P. *et al.* Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. (2004). *Cancer Cell* 5, 455-463.
- 71 Myzak, M. C., Dashwood, W. M., Orner, G. A., Ho, E. & Dashwood, R. H. Sulforaphane inhibits histone deacetylase in

- vivo and suppresses tumorigenesis in Apc-minus mice. (2006). *Faseb j* 20, 506-508.
- 72 Caslini, C. *et al.* Histone modifications silence the GATA transcription factor genes in ovarian cancer. (2006). *Oncogene* 25.
- 73 Yamada, N. *et al.* MUC2 expression is regulated by histone H3 modification and DNA methylation in pancreatic cancer. (2006). *Int J Cancer* 119, 1850-1857.
- 74 Ammanamanchi, S. & Brattain, M. G. Restoration of transforming growth factor-beta signaling through receptor RI induction by histone deacetylase activity inhibition in breast cancer cells. (2004). *J Biol Chem* 279, 32620-32625.
- 75 von Burstin, J. *et al.* E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. (2009). *Gastroenterology* 137, 361-371.
- 76 Tong, Z. T. *et al.* EZH2 supports nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by forming a co-repressor complex with HDAC1/HDAC2 and Snail to inhibit E-cadherin. (2012). *Oncogene* 31, 583-594.
- 77 Ma, Y. *et al.* Histone deacetylase 3 inhibits new tumor suppressor gene DTWD1 in gastric cancer. (2015). *Am J Cancer Res* 5, 663-673.
- 78 Feng, L. *et al.* Histone deacetylase 3 inhibits expression of PUMA in gastric cancer cells. (2013). *J Mol Med (Berl)* 91, 49-58.
- 79 Phi van, D. K., Muhlbauer, E. & Phi-van, L. Histone deacetylase HDAC1 downregulates transcription of the serotonin transporter (5-HTT) gene in tumor cells. (2015). *Biochim Biophys Acta* 1849, 909-918.
- 80 Juan, L. J. *et al.* Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. (2000). *J Biol Chem* 275, 20436-20443.
- 81 Brehm, A. *et al.* Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. (1998). *Nature* 391, 597-601.
- 82 Luo, R. X., Postigo, A. A. & Dean, D. C. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. (1998). *Cell* 92, 463-473.
- 83 Amann, J. M. *et al.* ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and

- binds mSin3A through its oligomerization domain. (2001). *Mol Cell Biol* 21, 6470-6483.
- 84 Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. (2000). *Nature* 403, 41-45, doi:10.1038/47412.
- 85 Chen, L. *et al.* Lysine acetyltransferase GCN5 potentiates the growth of non-small cell lung cancer via promotion of E2F1, cyclin D1, and cyclin E1 expression. (2013). *J Biol Chem* 288, 14510-14521.
- 86 Hu, C. *et al.* Upregulation of KLF4 by methylseleninic acid in human esophageal squamous cell carcinoma cells: Modification of histone H3 acetylation through HAT/HDAC interplay. (2014). *Mol Carcinog* 54, 1051-9.
- 87 Gayther, S. A. *et al.* Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. (2000). *Nat Genet* 24, 300-303.
- 88 Bandyopadhyay, D. *et al.* Down-regulation of p300/CBP histone acetyltransferase activates a senescence checkpoint in human melanocytes. (2002). *Cancer Res* 62, 6231-6239.
- 89 Iyer, N. G. *et al.* p300 is required for orderly G1/S transition in human cancer cells. (2007). *Oncogene* 26, 21-29.
- 90 Ogiwara, H. *et al.* Targeting p300 addiction in CBP-deficient cancers causes synthetic lethality via apoptotic cell death due to abrogation of MYC expression. (2015). *Cancer Discov.*
- 91 Leduc, C. *et al.* p14ARF promotes RB accumulation through inhibition of its Tip60-dependent acetylation. (2006). *Oncogene* 25, 4147-4154.
- 92 Hobbs, C. A. *et al.* Tip60 protein isoforms and altered function in skin and tumors that overexpress ornithine decarboxylase. (2006). *Cancer Res* 66, 8116-8122.
- 93 Gaughan, L., Logan, I. R., Cook, S., Neal, D. E. & Robson, C. N. Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. (2002). *J Biol Chem* 277, 25904-25913.
- 94 Halkidou, K. *et al.* Expression of Tip60, an androgen receptor coactivator, and its role in prostate cancer development. (2003). *Oncogene* 22, 2466-2477.
- 95 Awasthi, S. *et al.* A human T-cell lymphotropic virus type 1 enhancer of Myc transforming potential stabilizes Myc-TIP60 transcriptional interactions. (2005). *Mol Cell Biol* 25, 6178-6198.

- 96 Kim, J. H. *et al.* Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes. (2005). *Nature* 434, 921-926.
- 97 Sharma, M., Zarnegar, M., Li, X., Lim, B. & Sun, Z. Androgen receptor interacts with a novel MYST protein, HBO1. (2000). *J Biol Chem* 275, 35200-35208.
- 98 Contzler, R. *et al.* Histone acetyltransferase HBO1 inhibits NF-kappaB activity by coactivator sequestration. (2006). *Biochem Biophys Res Commun* 350, 208-213.
- 99 Zhou, M. I. *et al.* Jade-1, a candidate renal tumor suppressor that promotes apoptosis. (2005). *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11035-11040.
- 100 Ohta, K. *et al.* Histone acetyltransferase MOZ acts as a co-activator of Nrf2-MafK and induces tumour marker gene expression during hepatocarcinogenesis. (2007). *Biochem J* 402, 559-566.
- 101 Katsumoto, T. *et al.* MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. (2006). *Genes Dev* 20, 1321-1330.
- 102 Khan, O. & La Thangue, N. B. HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. (2012). *Immunol Cell Biol* 90, 85-94.
- 103 Lakshmaiah, K. C., Jacob, L. A., Aparna, S., Lokanatha, D. & Saldanha, S. C. Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors. (2014). *J Cancer Res Ther* 10, 469-478.
- 104 Mottamal, M., Zheng, S., Huang, T. L. & Wang, G. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. (2015). *Molecules* 20, 3898-3941.
- 105 Ravindra, K. C. *et al.* Inhibition of Lysine Acetyltransferase KAT3B/p300 Activity by a Naturally Occurring Hydroxynaphthoquinone, Plumbagin*. (2009). *J Biol Chem* 284, 24453-24464.
- 106 Warrenner, R. *et al.* Tumor cell-selective cytotoxicity by targeting cell cycle checkpoints. *Faseb j* 17, 1550-1552, doi:10.1096/fj.02-1003fje (2003).
- 107 Dokmanovic, M. & Marks, P. A. Prospects: histone deacetylase inhibitors. (2005). *J Cell Biochem* 96, 293-304.
- 108 Haberland, M., Montgomery, R. L. & Olson, E. N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. (2009). *Nat Rev Genet* 10, 32-42.

- 109 Mann, B. S., Johnson, J. R., Cohen, M. H., Justice, R. & Pazdur, R. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. (2007). *Oncologist* 12, 1247-1252.
- 110 Kelly, W. K. *et al.* Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer. (2005). *J Clin Oncol* 23, 3923-3931.
- 111 Shi, W. *et al.* Vorinostat as a radiosensitizer for brain metastasis: a phase I clinical trial. (2014). *J Neurooncol* 118, 313-319.
- 112 Bokhman, J. V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. (1983). *Gynecol Oncol* 15, 10-17.
- 113 Lax, S. F. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. (2004). *Virchows Arch* 444, 213-223.
- 114 Sarfstein, R., Bruchim, I., Fishman, A. & Werner, H. The mechanism of action of the histone deacetylase inhibitor vorinostat involves interaction with the insulin-like growth factor signaling pathway. (2011). *PLoS One* 6, e24468.
- 115 Ma, T. *et al.* Comparing histone deacetylase inhibitor responses in genetically engineered mouse lung cancer models and a window of opportunity trial in patients with lung cancer. (2013). *Mol Cancer Ther* 12, 1545-1555.
- 116 Saelen, M. G. *et al.* Radiosensitization by the histone deacetylase inhibitor vorinostat under hypoxia and with capecitabine in experimental colorectal carcinoma. (2012). *Radiat Oncol* 7, 165.
- 117 Piekarz, R. L. *et al.* Phase II multi-institutional trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin as monotherapy for patients with cutaneous T-cell lymphoma. (2009). *J Clin Oncol* 27, 5410-5417.
- 118 Whittaker, S. J. *et al.* Final results from a multicenter, international, pivotal study of romidepsin in refractory cutaneous T-cell lymphoma. (2010). *J Clin Oncol* 28, 4485-4491.
- 119 Coiffier, B. *et al.* Results from a pivotal, open-label, phase II study of romidepsin in relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma after prior systemic therapy. (2012). *J Clin Oncol* 30, 631-636.
- 120 Karthik, S., Sankar, R., Varunkumar, K. & Ravikumar, V. Romidepsin induces cell cycle arrest, apoptosis, histone

- hyperacetylation and reduces matrix metalloproteinases 2 and 9 expression in bortezomib sensitized non-small cell lung cancer cells. (2014). *Biomed Pharmacother* 68, 327-334.
- 121 Robertson, F. M. *et al.* The class I HDAC inhibitor Romidepsin targets inflammatory breast cancer tumor emboli and synergizes with paclitaxel to inhibit metastasis. (2013). *J Exp Ther Oncol* 10, 219-233.
- 122 Jones, S. F. *et al.* Phase 1 results from a study of romidepsin in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumors. (2012). *Cancer Invest* 30, 481-486.
- 123 Amiri-Kordestani, L. *et al.* Phase I trial of a new schedule of romidepsin in patients with advanced cancers. (2013). *Clin Cancer Res* 19, 4499-4507.
- 124 Poole, R. M. Belinostat: first global approval. (2014). *Drugs* 74, 1543-1554.
- 125 Ramalingam, S. S. *et al.* Phase II study of belinostat (PXD101), a histone deacetylase inhibitor, for second line therapy of advanced malignant pleural mesothelioma. (2009). *J Thorac Oncol* 4, 97-101.
- 126 Mackay, H. J. *et al.* Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor belinostat in women with platinum resistant epithelial ovarian cancer and micropapillary (LMP) ovarian tumours. (2010). *Eur J Cancer* 46, 1573-1579.
- 127 Giaccone, G. *et al.* Phase II study of belinostat in patients with recurrent or refractory advanced thymic epithelial tumors. (2011). *J Clin Oncol* 29, 2052-2059.
- 128 Cashen, A. *et al.* Phase II study of the histone deacetylase inhibitor belinostat (PXD101) for the treatment of myelodysplastic syndrome (MDS). (2012). *Ann Hematol* 91, 33-38.
- 129 Dizon, D. S. *et al.* A phase II evaluation of belinostat and carboplatin in the treatment of recurrent or persistent platinum-resistant ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. (2012). *Gynecol Oncol* 125, 367-371.
- 130 Dizon, D. S. *et al.* Phase II activity of belinostat (PXD-101), carboplatin, and paclitaxel in women with previously treated ovarian cancer. (2012). *Int J Gynecol Cancer* 22, 979-986.
- 131 Kirschbaum, M. H. *et al.* A phase 2 study of belinostat (PXD101) in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia or patients over the age of 60 with newly diagnosed

- acute myeloid leukemia: a California Cancer Consortium Study. (2014). *Leuk Lymphoma* 55, 2301-2304.
- 132 Thomas, A. *et al.* A phase I/II trial of belinostat in combination with cisplatin, doxorubicin, and cyclophosphamide in thymic epithelial tumors: a clinical and translational study. (2014). *Clin Cancer Res* 20, 5392-5402.
- 133 Ma, B. B. *et al.* The preclinical activity of the histone deacetylase inhibitor PXD101 (belinostat) in hepatocellular carcinoma cell lines. (2010). *Invest New Drugs* 28, 107-114.
- 134 Savickiene, J., Treigyte, G., Valiulienė, G., Stirblyte, I. & Navakauskiene, R. Epigenetic and molecular mechanisms underlying the antileukemic activity of the histone deacetylase inhibitor belinostat in human acute promyelocytic leukemia cells. (2014). *Anticancer Drugs* 25, 938-949.

3.2 ARTIGO DE PESQUISA

*Artigo formatado nas normas da revista *Histopathology*.

Expressão imuno-histoquímica das enzimas HDAC1, HDAC2 E HAT1 em queilites actínicas e carcinomas epidermóides de lábio.

Emanuely da Silva Chrun¹

Filipe Modolo Siqueira²

Daniella Serafim Couto Vieira²

Álvaro Luiz Socorro Borges Junior³

Renata Goulart Castro⁴

Filipe Ivan Daniel²

¹ Aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Mestrado).
Universidade Federal de Santa Catarina

² Dr. (a) Professor (a) do Departamento de Patologia. Universidade
Federal de Santa Catarina.

³ Aluno de Graduação em Odontologia (Iniciação Científica)

⁴ Dra. Professora do Departamento de Odontologia. Universidade
Federal de Santa Catarina

Autor de Correspondência:

*Prof. Dr. Filipe Ivan Daniel,
Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde.
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário
Trindade- Florianópolis-SC, Rua Delfino Conti, s/n, CEP: 88040-370.*

RESUMO

A acetilação e a desacetilação estão entre as modificações covalentes de histonas mais estudadas. As histonas desacetilases (HDAC) e histona acetiltransferases (HAT) estão relacionadas com a regulação da transcrição. A produção desregulada dessas enzimas, responsáveis por esse fenômeno, induz a transcrição aberrante de genes-chave que regulam as funções celulares importantes, tais como a proliferação, a regulação do ciclo celular e apoptose. Com isso, a expressão de diferentes tipos de HDAC e HAT. Tem sido avaliada em diversos tumores malignos. Este estudo objetivou investigar a expressão imuno-histoquímica das enzimas HDAC1, HDAC2 e HAT1 em carcinoma

epidermoide de lábio (CEL) e queilite actínica (QA). Foram avaliados 30 casos de CEL, 30 casos de QA e 28 casos de epitélio não neoplásico (ENN), como controle. Houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de porcentagem de imunopositividade de HDAC2 entre os grupos de QA ($75,07\% \pm 29,70$) e CEL ($51,06\% \pm 39,02$) (Teste de Kruskal-Wallis, $p=0,022$). Para HDAC1 as porcentagens de imunomarcção foram de $77,49\% (\pm 24,95)$ no grupo das QA, $74,76\% (\pm 25,78)$ nos CEL e $67,73\% (\pm 29,14)$ no grupo dos ENN (Teste de Kruskal-Wallis, $p=0,3625$) enquanto para HAT1, as QA mostraram média de imunopositividade de $89,59\% (\pm 13,12)$, os CEL $87,02\% (\pm 14,56)$, e os ENN $84,81\% (\pm 19,67)$ (Teste de Kruskal-Wallis, $p=0,7134$). Este estudo mostrou maiores níveis de imunopositividade nas QA e nos CEL para todas as enzimas em relação ao ENN, caracterizando a sobre-expressão em grande parte dos casos. A confirmação futura de que estas alterações possam estar envolvidas no desenvolvimento do câncer de lábio, permitirá a sua utilização como marcadores de diagnóstico e prognóstico, especialmente das lesões potencialmente malignizáveis, além de poder evitar ou reduzir procedimentos cirúrgicos por vezes mutiladores por permitir o uso de inibidores de HDAC (HDACi) no tratamento dessas lesões.

PALAVRAS-CHAVE: Histonas Desacetilases, Histona Acetiltransferase, Câncer Labial, Queilite, Imuno-histoquímica

ABSTRACT

Acetylation and deacetylation are the most studied covalent modifications of histones. Histone deacetylases (HDAC) and histone acetyltransferases (HAT) are related to transcriptional regulation and unregulated production of enzymes, responsible for this phenomenon, induces aberrant transcription of key genes that regulate important cellular functions such as proliferation, cell cycle regulation and apoptosis. Thus, the expression of different types of HAT and HDAC has been evaluated in several malignant tumors. This study aimed to investigate HDAC1, HDAC2, and HAT1 immunohistochemical expression in lip squamous carcinoma (LSCC) and actinic cheilitis (AC). A total of 30 cases of LSCC, 30 cases of QA and 28 cases of non-neoplastic epithelium (NNE), as control, were evaluated. There was a statistically significant difference between the mean percentages of nuclear immunopositivity of HDAC2 between AC ($75.07\% \pm 29.70$) and LSCC ($51.06\% \pm 39.02$) groups (Kruskal-Wallis test, $p = 0.022$). HDAC1 nuclear immunostaining percentages were $77.49\% (\pm 24.95)$ in the AC group, $74.76\% (\pm 25.78)$ in the LSCC, and $67.73\% (\pm 29.14)$ in

the NNE, while for HAT1, AC showed mean nuclear immunopositivity of 89.59% (\pm 13.12), LSCC 87.02% (\pm 14.56), and NNE of 84.81% (\pm 19.67). This study showed higher levels of nuclear immunopositivity in AC and SCCL for all enzymes in relation to NNE, characterizing overexpression in most cases. Future confirmation that these alterations are involved in lip cancer development will allow its use as a diagnostic and prognosis marker, especially in precancerous injuries, preventing or reducing maiming surgical procedures even by the use of HDAC inhibitors (HDACi) in the treatment of these diseases.

KEYWORDS: Histones deacetylases, Histone Acetyltransferases, Lip Cancer, Actinic Cheilitis, Immunohistochemistry

INTRODUÇÃO

De acordo com a estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS, Globocan, 2012), o câncer intraoral e de lábio representa 2,1% de todos os tipos de cânceres. A queilite actínica (QA) e o carcinoma epidermoide de lábio (CEL) são lesões relativamente comuns em países tropicais como resultado da exposição crônica à radiação ultravioleta, que é capaz de conduzir a alterações genéticas ¹ e epigenéticas ² das células epiteliais, em um processo denominado fotocarcinogênese. QA, em grande número dos casos é a lesão potencialmente malignizável precursora dos CEL ^{3, 4}.

Os processos epigenéticos aberrantes estão entre as alterações moleculares que ocorrem no processo de carcinogênese. A epigenética estuda a regulação da expressão de um gene sem alterar a sequência de nucleotídeos ao DNA ⁵. Modificações epigenéticas descontroladas podem ocorrer já em um estágio inicial do desenvolvimento neoplásico ⁶. Os tipos e mecanismos epigenéticos principalmente estudados são: metilação do DNA, miRNAs e modificações de histonas ⁵.

As histonas são as principais proteínas que, juntamente ao DNA, formam o nucleossomo. Enzimas modificadoras de histonas catalisam a adição ou remoção de uma série de modificações covalentes em histonas e proteínas não-histonas, dentro do nucleossomo incluindo acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação e sumoilação. Esses fenômenos controlam, em parte, a acessibilidade ao DNA ⁷. Dentro do contexto da cromatina, estas modificações regulam a expressão do gene, bem como outras funções genômicas e tem sido implicadas na criação de um código epigenético hereditário que contribui para a definição da identidade e destino da célula ⁸. A modificação de histonas mais estudada é a acetilação ⁹, controlada por duas enzimas: histona acetiltransferase (HAT) e histona desacetilase (HDAC). HATs

promovem a acetilação, catalisando a transferência do grupamento acetil da acetil-CoA para os resíduos de lisina de histonas. Esse evento faz com que as lisinas carregadas positivamente sejam neutralizadas, diminuindo sua atração ao DNA, negativamente carregado, afastando as moléculas e resultando assim em maior acesso aos fatores de transcrição e RNA polimerase, favorecendo a transcrição do gene. As HDACs, por outro lado, promovem a remoção dos grupamentos acetil, devolvendo a carga positiva à lisina que será novamente atraída pela negatividade dos grupamentos fosfato resultando na diminuição do acesso ao DNA, gerando silenciamento transcricional ¹⁰.

A expressão de HATs e HDACs tem sido avaliada em diferentes tumores malignos e tecidos normais, no intuito de melhor entender o comportamento molecular dessas proteínas na carcinogênese ¹¹. Além disso, ensaios clínicos de alguns inibidores de HDAC (HDACi) para utilização como drogas antineoplásicas estão em curso e algumas delas já têm aprovação pela FDA (*Food and Drug Administration*) para tratar de neoplasias hematológicas ¹².

Assim, tem-se tornado cada vez mais importante o conhecimento do padrão de expressão dessas enzimas visando inclusive a possível utilização de inibidores capazes de recuperar a adequada regulação epigenética da expressão de genes chave no processo de carcinogênese. Diante da escassez de estudos relacionados à fotocarcinogênese labial, este trabalho teve como objetivo investigar a expressão de HAT1, HDAC1 e HDAC2 em QA e CEL.

MÉTODOS

Seleção da Amostra

A amostra foi composta por 30 casos de lesão potencialmente malignizável do tipo Queilite Actínica (QA) e 30 casos de Carcinoma Epidermoide de Lábio (CEL). Estas amostras teciduais foram selecionadas, por conveniência, do arquivo de casos do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB-UFSC) e do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário (SAP-HU) da UFSC. Como grupo controle, devido à inviabilidade de obtenção de fragmentos de lábio saudável foram utilizados 28 casos de epitélio não neoplásico (ENN) provenientes de mucocelos de lábio com revestimento de epitélio de mucosa, desprovidas de componente inflamatório, em que os pacientes não apresentavam alterações imunológicas ou tratamento antineoplásico prévio. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (parecer número 1.020.518). Os pacientes envolvidos na pesquisa

assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Não foram selecionadas amostras múltiplas do mesmo paciente e nenhum deles havia recebido tratamento quimioterápico ou radioterápico.

Todos os casos foram examinados histologicamente, simultaneamente, por dois examinadores previamente calibrados que determinaram o diagnóstico, grau de displasia epitelial nas QA, segundo os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (2005)¹³ e segundo a classificação Binária¹⁴, e grau de diferenciação histopatológica nos CEL, de acordo com a OMS¹³.

Reação imuno-histoquímica

As enzimas estudadas foram detectadas por imuno-histoquímica com o método estreptavidina-biotina-peroxidase. Os espécimes, fixados em formol à 10% e embebidos em parafina, foram seccionados a 3µm de espessura. Para a desparafinização, as lâminas foram mantidas em estufa por 90 min a 75°C, seguido por 30 min em xilol a 60°C e 20 min a temperatura ambiente, depois reidratados em grade decrescente de etanol. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado em H₂O₂ a 6% em metanol em dois banhos de 20 min. Para a recuperação antigênica utilizou-se tampão citrato 0,01M, pré-aquecido em banho-maria, por 40 minutos a 96°C. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado em solução de leite desnatado a 5% em tampão fosfato (PBS) durante 60 minutos. Os espécimes foram incubados com os anticorpos anti-HDAC1 (SC7872, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA, diluição 1:200), anti-HDAC2 (SC7899, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA, diluição 1:200) e anti-HAT1 (SC8752, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA, diluição 1:500) a 4°C *overnight*. Posteriormente procedeu-se a utilização do Kit LSAB (Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA) com anticorpo secundário biotilado e complexo streptavidina-biotina-peroxidase. Para revelação da reação foi aplicada a solução cromógena Diaminobenzidina 3,3'(DAB, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA). Todos os espécimes receberam contra coloração com Hematoxilina de Harris. Como controle positivo utilizou-se cortes de placenta, em que a imunopositividade para as enzimas foi previamente determinada e para controle negativo, foi omitido o anticorpo primário da sequência da reação.

Avaliação da reação imuno-histoquímica

Foi avaliada a imunorreatividade nuclear para HDAC1, HDAC2 e HAT1, nas células epiteliais dos ENNs e das QAs, e células neoplásicas nos CEL. Dentro do grupo dos CEL, foram selecionados 13

casos que apresentaram epitélio de revestimento não neoplásico (ERNN) adjacente à área de invasão tumoral.

Um único examinador foi previamente submetido a uma calibração na qual foram examinados, em 4 momentos, 30 campos com intervalo de 1 semana, obtendo-se o coeficiente de correlação intraclasse de 0,86. Realizou-se então, a contagem de pelo menos 500 células, para cada amostra de ENN, QA e CEL, utilizando o *software ImageJ* versão 1.410 (National Institute of Health, Bethesda, EUA), em 5 campos equidistantes capturados em magnificação de 400X sob microscópio de luz (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Nos ERNN foram capturados 6 campos consecutivos, imediatamente adjacentes à área de invasão tumoral. A imunopositividade para cada amostra foi expressa em porcentagem de células positivas sobre o total de células contadas.

Análise da sobre-expressão

Afim de comparar os resultados obtidos, com os dados publicados na literatura, foi estabelecida a sobre-expressão de cada proteína nos grupos de QA e CEL. Tomou-se como parâmetro a média de porcentagem de imunorreatividade do grupo de ENN, considerando sobre-expressos os casos de QA e CEL em que a porcentagem de expressão de cada proteína excedesse a média de expressão da mesma no ENN.

Análise estatística

O *Software Action* versão 2.3 (Estatcamp, São Carlos-SP, Brasil) foi utilizado para a análise estatística dos dados. Como não houve distribuição normal dos dados, utilizou-se testes estatísticos não paramétricos. Para comparação da incidência de imunopositividade de cada enzima entre os grupos, e também para a comparação da imunomarcagem com o grau de displasia nas QA e com o grau de diferenciação histopatológica nos CEL, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para analisar a possível correlação das proteínas entre si. Foi adotado o nível de significância de 0,05 para os testes estatísticos aplicados.

RESULTADOS

As amostras foram obtidas de 88 pacientes, sendo 52% do sexo masculino e 49% do sexo feminino, com média de idade de $43,03 \pm 23,2$ anos (média \pm desvio padrão). As características dos pacientes envolvidos no estudo são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Características dos participantes do estudo.

Característica		ENN	QA	CEL
Amostra		28	30	30
Sexo	Feminino	75%	56,7%	30%
	Masculino	25%	43,3%	70%
Idade	Média (±desvio padrão)	15,15 (±8,92)	51,1 (±14,07)	59,4 (±16,13)
	Amplitude	4-40	24-79	33-96

ENN: Epitélio Não Neoplásico; QA: Queilite Actínica; CEL: Carcinoma Epidermoide de Lábio

Houve diferença estatisticamente significativa quando se comparou a média de percentagem de células positivas para HDAC2 entre os grupos de QA e de CEL, sendo a HAT1 a enzima com as maiores médias de percentagem de imunopositividade (Gráfico 1). As médias da percentagem de células positivas para HDAC1, HDAC2 e HAT1 são apresentadas nas Tabelas 2-4. Com 95% de confiança, a verdadeira percentagem de núcleos positivos para cada uma das proteínas dentro dos grupos pode ser vista no Gráfico 2.

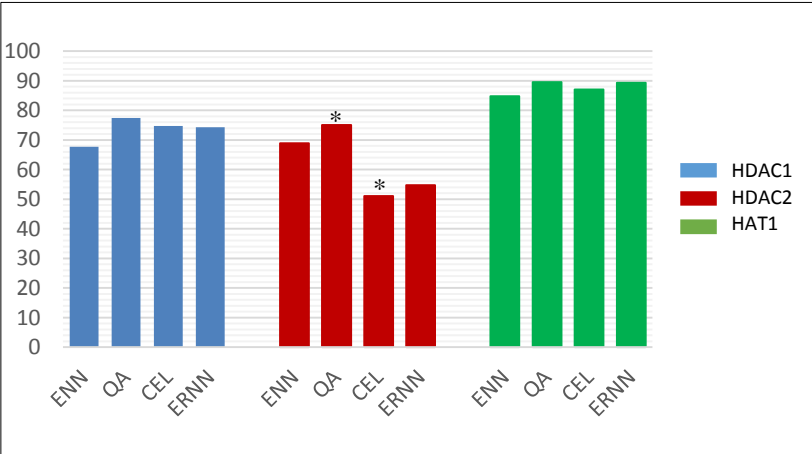
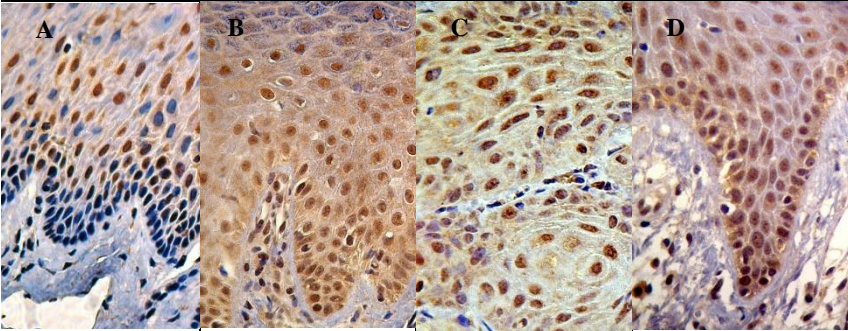


Gráfico 1. Distribuição das médias de percentagem de núcleos positivos para HDAC1, HDAC2 e HAT1 nos grupos dentro da amostra estudada. *Diferença estatisticamente significativa entre os grupos QA e CEL ($p<0,05$), Kruskal-Wallis.

Tabela 2. Incidência de imunomarcção nuclear para HDAC1 (% , média \pm desvio padrão)

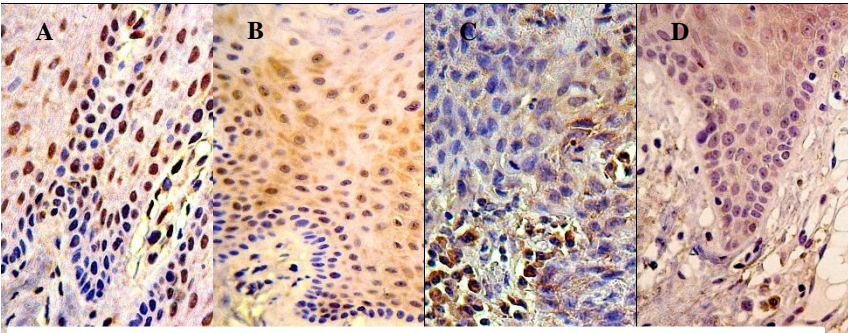
ENN	QA	CEL	ERNN
67,73 \pm 29,14	77,49 \pm 24,95	74,76 \pm 25,78	74,31 \pm 30,89



$p = 0,3625$ (Kruskal-Wallis). Aumento de 400x

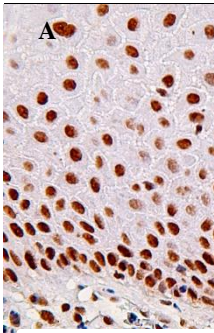
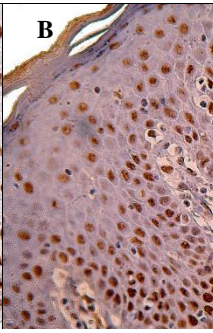
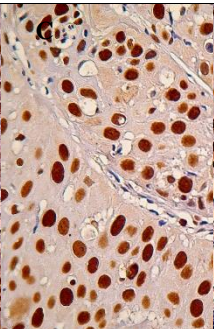
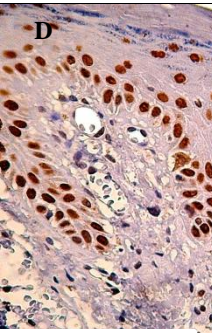
Tabela 3. Incidência de imunomarcção nuclear para HDAC2 (% , média \pm desvio padrão)

ENN	QA	CEL	ERNN
68,93 \pm 24,00	75,07 \pm 29,70*	51,06 \pm 39,02*	54,75 \pm 43,44



*Diferença estatisticamente significante. $p = 0,0227$ (Kruskal-Wallis).
Aumento de 400x

Tabela 4. Incidência de imunomarcção nuclear para HAT1 (% , média ±desvio padrão)

ENN	QA	CEL	ERNN
84,81 ±19,67	89,59 ±13,12	87,02 ±14,56	89,32 ±14,68
			

$p = 0,7134$ (Kruskal-Wallis). Aumento de 400x

Nos três terços do epitélio (inferior, médio e superior), foi possível observar que a imunoexpressão nuclear para todas as enzimas ocorreu nas células da maioria dos espécimes de ENN, QA e ERNN. Pelo menos a metade dos casos mostrou imunomarcção nuclear difusa nas células neoplásicas do grupo dos CEL.

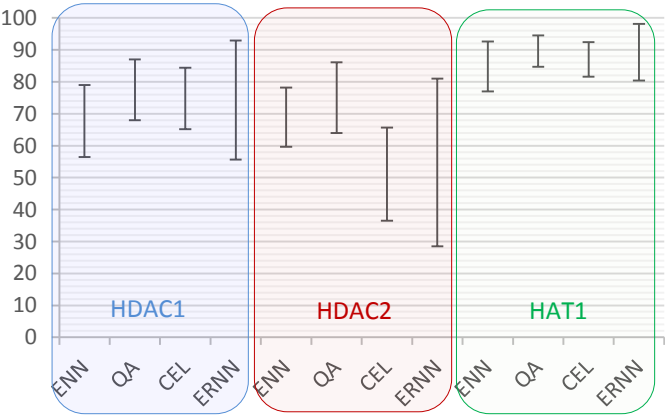


Gráfico 2. Intervalos de confiança das porcentagens de núcleos positivos para HDAC1, HDAC2 e HAT1 nos grupos pesquisados.

Foi constatado que a HDAC1 esteve sobre-expressa em 77% dos casos de QA e em 70% dos casos de CEL. A HDAC2 mostrou-se com expressão maior que a média da porcentagem de sua imunomarcção no ENN em 70% nas QA e 46% nos CEL. E, a imunopositividade da HAT1 esteve acima da média do ENN em 80% das QA e 67% dos CEL.

A comparação da imunorreatividade entre o grau de displasia nas QA, tanto conforme a OMS quanto pela Classificação Binária, e a diferenciação histopatológica dos CEL de acordo com a OMS, pelo teste de Kruskal-Wallis, não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Esses dados estão demonstrados nos Gráficos 3-5.

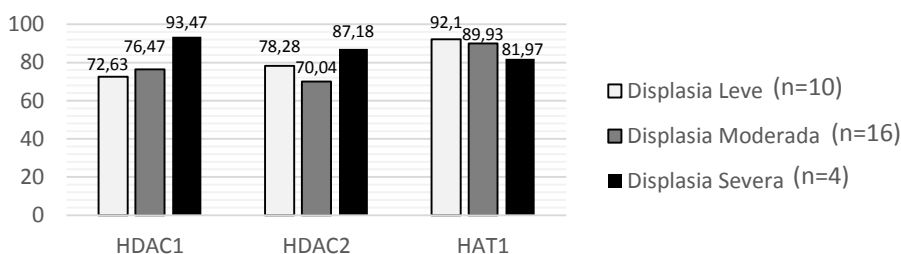


Gráfico 3. Distribuição das médias de porcentagem de núcleos positivos para HDAC1, HDAC2 e HAT1 nas QA conforme o grau de displasia (OMS, 2005).

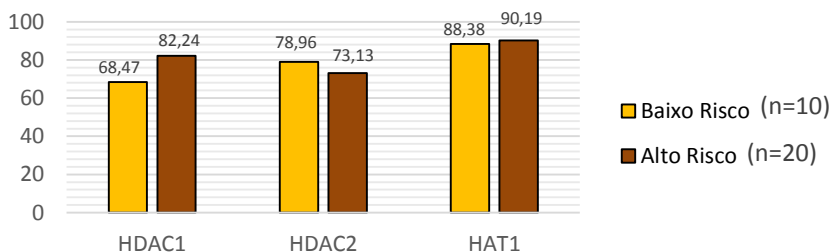


Gráfico 4. Distribuição das médias de porcentagem de núcleos positivos para HDAC1, HDAC2 e HAT1 nas QA de acordo com a classificação binária (Kujan, 2006).

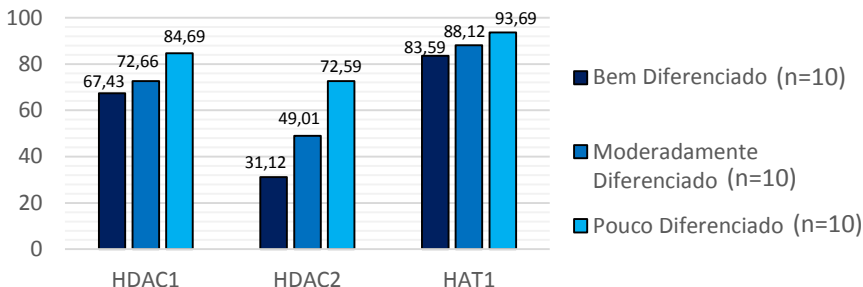


Gráfico 5. Distribuição das médias de porcentagem de núcleos positivos para HDAC1, HDAC2 e HAT1 nos CEL de acordo com a diferenciação histopatológica (OMS,2005).

Testando a correlação entre as três enzimas, por meio do Coeficiente de Correlação de Spearman, foi possível encontrar correlação entre a imunopositividade das enzimas dentro dos grupos de ENN e CEL. No ENN, a correlação foi moderada ¹⁵ entre a HAT1 e a HDAC1 ($r=0,55$; $p=0,002$) e entre a HAT1 e a HDAC2 ($r=0,38$; $p=0,04$). No CEL, foi constatada correlação forte entre HDAC2 e HAT1 ($r=0,71$; $p=0,006$) e moderada entre HDAC2 e HDAC1 ($r=0,49$; $p=0,000008$) e entre HAT1 e HDAC1 ($r=0,39$; $p=0,035$).

DISCUSSÃO

As enzimas modificadoras de histonas têm papel fundamental na regulação da expressão gênica tendo sido implicadas na criação de um código epigenético hereditário que contribui para a definição da identidade e destino celular ⁸. A acetilação de histonas parece influenciar vários processos celulares como a progressão do ciclo celular, a dinâmica dos cromossomos, a reparação e a recombinação do DNA e a apoptose ¹⁶. Vários estudos encontraram expressão aberrante dos diferentes tipos de HDACs em tumores malignos humanos ^{11, 17-22}. Dos 18 tipos de HDACs, a HDAC1 e a HDAC2 são as mais investigadas ^{11, 17, 18, 20, 23-32}, inclusive como alvos de agentes antitumorais, buscando a re-expressão de genes supressores tumorais silenciados pela ação das HDACs ³³⁻³⁶. Até o presente momento, não foram publicados dados comparando a expressão de HDAC1, HDAC2 e HAT1 em câncer de boca, lesões potencialmente cancerizáveis e tecidos não neoplásicos. Por esta razão, este estudo descreve, pela primeira vez, a expressão dessas três enzimas em uma série de casos de CEL, QA, ERNN e ENN.

A média da porcentagem de imunomarcção nuclear de HDAC2 aumentou do ENN para a QA porém diminuiu para o CEL, com diferença estatisticamente significativa nesta última comparação, o que sugere a participação dessa enzima nas fases iniciais da oncogênese labial. Observando-se o intervalo de confiança, pode-se dizer que os valores de imunomarcção para essa enzima, extrapolados para uma população com 95% de confiança, manter-se-iam menores no CEL em relação à QA. Estes resultados se opõem ao estudo de Chang *et al.* (2009)³² no qual a expressão nuclear de HDAC2 foi relatada como significativamente maior no carcinoma epidermoide intraoral e labial (59,8%) do que no epitélio displásico (25,8%). Porém, como foram analisados casos de carcinoma epidermoide em diferentes sítios (intraorais e lábio), é importante considerar o fato de que tumores malignos com locais anatômicos distintos têm fatores etiológicos diferentes e variadas características genéticas e, possivelmente, também epigenéticas. Assim, esta divergência sugere que o aumento da HDAC2 possa ter maior relação com carcinoma epidermoide induzido por fumo e álcool, enquanto o aumento da mesma enzima possa estar mais relacionado às fases iniciais da carcinogênese fotoinduzida. Assim, sugere-se que, dependendo do fator etiológico, a alteração na expressão dessa enzima ocorrerá em uma fase diferente do processo tumoral. Ainda, foi possível observar sobre-expressão de HDAC2 em 46% dos casos de CEL e em 70% dos casos de QA, enquanto Theocaris *et al.* (2011)²³ demonstrou sobre-expressão da mesma proteína em 57,14% dos casos de carcinoma epidermoide de língua, novamente reforçando o possível papel dessa enzima em fases iniciais da carcinogênese labial.

Embora sem significância estatística, percebe-se que a tendência da HDAC1 é aumentar na QA e diminuir no CEL, tanto ao observar a média de imunoexpressão quanto ao se considerar os casos em que houve sobre-expressão dessa enzima, sugerindo que o aumento da HDAC1 possa também interferir nas fases iniciais da oncogênese fotoinduzida. Neste estudo houve 70% de casos com sobre-expressão de HDAC1 nos CEL, e o resultado encontrado por Theocaris *et al.* (2011)²³ para HDAC1 em carcinoma epidermoide de língua, foi a sobre-expressão dessa enzima em 55,1% dos casos.

A HAT1 inicialmente foi identificada como uma enzima HAT do tipo B, localizada no citoplasma celular e que acetila a histona recém-sintetizada, exercendo função na deposição da cromatina durante a replicação¹⁶. Porém evidências a partir de estudos bioquímicos utilizando células de levedura e humanas mostraram que a HAT1 apresenta padrão de distribuição muito mais variado e complexo do que

inicialmente relatado, e está localizada principalmente no núcleo celular^{37, 38}. Em conformidade com essas afirmações, neste estudo foi observada a imunomarcagem exclusivamente nuclear da HAT1.

Embora inicialmente tenha sido proposto à HAT1 uma função oposta à inativação da transcrição de genes supressores tumorais (realizada pelas HDACs), a expressão da acetiltransferase foi semelhante ou até maior que a das desacetilases, podendo sugerir que a HAT1 esteja mais relacionada à ativação de oncogenes do que à regulação de genes supressores tumorais, ou que o equilíbrio entre a expressão e/ou atividade, ainda desconhecido, dessas proteínas influencie no processo de oncogênese. Também deve-se considerar outras possíveis funções dessa enzima, já que a HAT1 tem sido relacionada à viabilidade celular³⁹, essa função explicaria a elevada expressão dessa enzima em todos os grupos deste estudo. Outra função importante da HAT1 foi identificada por Tafrova e Tafrov (2014)⁴⁰, que sugeriram seu papel fundamental para a clonogenicidade de células de adenocarcinoma de colo uterino *in vivo*, ou seja, a HAT1 seria indispensável para a capacidade de divisão celular das células neoplásicas. Da mesma maneira, esta pode ser sua principal função na carcinogênese labial, especialmente nas fases iniciais, visto que foi verificada a sobre-expressão de HAT1 em 87% das QA e 65% dos casos de CEL. A HAT1 pode atuar de forma sinérgica com as HDACs, especialmente com a HDAC2, que mostrou correlação positiva forte com a HAT1 no grupo dos CEL, ou seja, a HAT1 atuando como ativadora de oncogenes e a HDAC2 no silenciamento de genes supressores tumorais.

O subgrupo dos ERNN apresentou média de imunopositividade semelhante ao CEL nas três enzimas estudadas. Isso sugere que o epitélio adjacente ao tumor, apesar das características moleculares pouco específicas, já apresenta alterações. Contudo, pelo fato de ter um número amostral bastante reduzido (n=13), esse subgrupo apresentou resultados de porcentagem de imunopositividade bastante amplos e sem significância estatística.

Ao se comparar a média de porcentagem de imunopositividade das enzimas dentro dos graus de displasia das QA, a HDAC1, tanto pela classificação da OMS quanto pela classificação Binária, apresentou uma maior elevação da expressão em função do aumento da gravidade da displasia, principalmente da displasia moderada para a displasia intensa, podendo contribuir para as alterações fenotípicas das células. Com relação à diferenciação histopatológica dos CEL (OMS, 2005), todas as enzimas estudadas (HDAC1, HDAC2 e HAT1) revelaram uma média

crescente de imunopositividade do carcinoma bem diferenciado para o moderadamente diferenciado e pouco diferenciado. Dessa forma, demonstra-se que à medida que as células se mostram menos diferenciadas, existe uma maior expressão dessas enzimas.

Alguns estudos mostram que a alteração da expressão de proteínas como a p53^{41, 42}, pode ter função importante na iniciação da fotocarcinogênese labial⁴³ e que a acetilação de p53 é necessária para seu funcionamento fisiológico e a sua desacetilação aberrante pode estar relacionada ao processo de carcinogênese. Já foi visto que a utilização de medicamentos inibidores de HDAC (HDACi) leva a re-expressão de p53^{44, 45}. Nandakumar, 2010, encontrou resultados que demonstram que a exposição crônica à radiação ultravioleta do tipo B (UVB) induz a hipermetilação do DNA, aumentando a atividade das DNA metiltransferases, que recrutam HDAC para as ilhas CpG hipermetiladas, e sugerem que esses eventos estão envolvidos no silenciamento de genes supressores de tumores e na fotocarcinogênese de pele. Com os resultados obtidos, é possível inferir que o mesmo possa ocorrer nas fases iniciais da fotocarcinogênese labial.

É importante ressaltar que os resultados desta pesquisa apresentam limitações intrínsecas da técnica imunohistoquímica, seja por um possível viés na sua quantificação quanto pelo fato de não se poder avaliar a atividade destas enzimas. Além disso é possível que um tecido completamente normal apresente menor expressão dessas proteínas, entretanto, não foi possível a sua obtenção, por questões éticas.

Contudo, essa pesquisa permitiu um melhor entendimento do comportamento da expressão dessas enzimas nos tecidos estudados, mostrando a possível participação da HDAC2 nas fases iniciais da fotocarcinogênese labial. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de QA e CEL para HDAC2, o que sugere a participação dessa proteína nas fases iniciais da fotocarcinogênese labial.

REFERÊNCIAS

1. D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. Uv radiation and the skin. *Int j mol sci*, 2013; 12222-12248.
2. Gronniger E, Weber B, Heil O et al. Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. *PLoS Genet* 2010; 6: e1000971.
3. Jadotte YT, Schwartz RA. Solar cheilosis: An ominous precursor: Part i. Diagnostic insights. *J Am Acad Dermatol* 2012; 66: 173-184.
4. Calcaianu N, Popescu SA, Diveica D, Lascar I. Surgical attitude in premalignant lesions and malignant tumors of the lower lip. *J Med Life* 2015; 8:109-111.
5. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:143-153.
6. Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clinical Genetics* 2014; 81: 303-311.
7. Skene PJ, Henikoff S. Histone variants in pluripotency and disease. *Development* 2013; 140: 2513-2524.
8. Marmorstein R, Trievel RC. Histone modifying enzymes: Structures, mechanisms, and specificities. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1789: 58-68.
9. Cress WD, Seto E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol* 2000; 184: 1-16.
10. Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol* 2004; 14: 546-551.
11. Nakagawa M, Oda Y, Eguchi T et al. Expression profile of class i histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncol Rep* 2007; 18: 769-774.
12. Mottamal M, Zheng S, Huang TL, Wang G. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules* 2015; 20: 3898-3941.
13. Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D. Surgical pathology of the head and neck, 2005.
14. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol* 2006; 42: 987-993.
15. Barbetta PA. Estatística aplicada às ciências sociais. 9 ed, 2012; 315.
16. Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 81-120.

17. Lee SH, Yoo C, Im S, Jung JH, Choi HJ, Yoo J. Expression of histone deacetylases in diffuse large b-cell lymphoma and its clinical significance. *Int J Med Sci* 2014; 11: 994-1000.
18. Krusche CA, Wulfig P, Kersting C et al. Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: A tissue microarray analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 90: 15-23.
19. Yang H, Maddipoti S, Quesada A et al. Analysis of class i and ii histone deacetylase gene expression in human leukemia. *Leuk Lymphoma* 2015; 56: 3426-33.
20. Hayashi A, Horiuchi A, Kikuchi N et al. Type-specific roles of histone deacetylase (HDAC) overexpression in ovarian carcinoma: HDAC1 enhances cell proliferation and hdac3 stimulates cell migration with downregulation of e-cadherin. *Int J Cancer* 2010; 127: 1332-1346.
21. Giaginis C, Alexandrou P, Delladetsima I, Giannopoulou I, Patsouris E, Theocharis S. Clinical significance of histone deacetylase (HDAC)-1, HDAC-2, HDAC-4, and HDAC-6 expression in human malignant and benign thyroid lesions. *Tumour Biol* 2014; 35: 61-71.
22. Gruhn B, Naumann T, Gruner D et al. The expression of histone deacetylase 4 is associated with prednisone poor-response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2013; 37: 1200-1207.
23. Theocharis S, Klijanienko J, Giaginis C et al. Histone deacetylase-1 and -2 expression in mobile tongue squamous cell carcinoma: Associations with clinicopathological parameters and patients survival. *J Oral Pathol Med* 2011; 40: 706-714.
24. Adams H, Fritzsche FR, Dirnhof S, Kristiansen G, Tzankov A. Class i histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in classical hodgkin's lymphoma. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14: 577-584.
25. Krusche CA, Vloet AJ, Classen-Linke I, von Rango U, Beier HM, Alfer J. Class I histone deacetylase expression in the human cyclic endometrium and endometrial adenocarcinomas. *Hum reprod. England*, 2007; 22: 2956-2966.
26. Suzuki J, Chen YY, Scott GK et al. Protein acetylation and histone deacetylase expression associated with malignant breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3163-3171.
27. Muller BM, Jana L, Kasajima A et al. Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer--overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC Cancer* 2013; 13: 215.

28. Sasaki H, Moriyama S, Nakashima Y et al. Histone deacetylase 1 mrna expression in lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 46: 171-178.
29. Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. Upregulation and nuclear recruitment of hdac1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 2004; 59: 177-189.
30. Weichert W, Roske A, Gekeler V et al. Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and hdac2 expression is associated with shorter psa relapse time after radical prostatectomy. *Br J Cancer* 2008; 98: 604-610.
31. Ishihama K, Yamakawa M, Semba S et al. Expression of hdac1 and cbp/p300 in human colorectal carcinomas. *J Clin Pathol* 2007; 60: 1205-1210.
32. Chang HH, Chiang CP, Hung HC, Lin CY, Deng YT, Kuo MY. Histone deacetylase 2 expression predicts poorer prognosis in oral cancer patients. *Oral Oncol*, 2009; 45: 610-4.
33. Huang BH, Laban M, Leung CH et al. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21cip1/waf1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ* 2005; 12: 395-404.
34. Lin YC, Lin JH, Chou CW, Chang YF, Yeh SH, Chen CC. Statins increase p21 through inhibition of histone deacetylase activity and release of promoter-associated HDAC1/2. *Cancer Res* 2008; 68: 2375-2383.
35. Zhao Y, Lu S, Wu L et al. Acetylation of p53 at lysine 373/382 by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide induces expression of p21(waf1/cip1). *Mol Cell Biol* 2006; 26: 2782-2790.
36. Hrzenjak A, Moinfar F, Kremser ML et al. Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2203-2210.
37. Verreault A, Kaufman PD, Kobayashi R, Stillman B. Nucleosomal dna regulates the core-histone-binding subunit of the human hat1 acetyltransferase. *Curr Biol* 1998; 8: 96-108.
38. Parthun MR. Histone acetyltransferase 1: More than just an enzyme? *Biochim Biophys Acta* 2012; 1819:256-263.
39. Nagarajan P, Ge Z, Sirbu B et al. Histone acetyl transferase 1 is essential for mammalian development, genome stability, and the processing of newly synthesized histones h3 and h4. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003518.

40. Tafrova JI, Tafrov ST. Human histone acetyltransferase 1 (hat1) acetylates lysine 5 of histone h2a in vivo. *Mol Cell Biochem* 2014; 92: 259-72.
41. Martinez A, Brethauer U, Borlando J, Spencer ML, Rojas IG. Epithelial expression of p53, mdm-2 and p21 in normal lip and actinic cheilitis. *Oral Oncol* 2008; 44: 878-883.
42. de Freitas Mda C, Ramalho LM, Xavier FC, Moreira AL, Reis SR. P53 and mdm2 protein expression in actinic cheilitis. *J Appl Oral Sci* 2008; 16: 414-419.
43. Shah AY, Doherty SD, Rosen T. Actinic cheilitis: A treatment review. *Int J Dermatol* 2010; 49: 1225-1234.
44. Kim MS, Kwon HJ, Lee YM et al. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat med. United States*, 2001; 7: 437-443.
45. Juan LJ, Shia WJ, Chen MH et al. Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 20436-20443.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O CEL é uma doença comum em países tropicais, como o Brasil, por estarem na zona de maior incidência de raios solares do planeta. A queilite actínica é a lesão que precede o CEL, onde podem ser notados indícios clínicos e histopatológicos antes da invasão tumoral propriamente dita. Porém, pela QA ser uma lesão de aparência indolente, de progressão lenta, muitos pacientes acreditam que seja uma condição labial normal decorrente do envelhecimento e não procuram meios de evitar sua progressão.

A partir dos dados apresentados, este trabalho aventou a possibilidade da participação das enzimas modificadoras de histonas nas fases iniciais da fotocarcinogênese. Tendo em vista que um grande dilema da prática clínica é o manejo das lesões potencialmente malignizáveis, marcadores para estas lesões na transformação maligna podem ser implementados na prática atual de diagnóstico para ajudar os profissionais a estratificar objetivamente os pacientes em grupos de acompanhamento/tratamento de acordo com o risco relativo para transformação maligna (Dionne *et al.*, 2015). Pode-se sugerir que novos estudos com metodologia mais específica, capaz de melhor quantificar e investigar a atividade dessas proteínas modificadoras de histonas, para que elas possam ser vistas com utilidade nesse âmbito.

Frente a impossibilidade, por questões éticas, de utilizar tecido de semimucosa labial completamente normal, utilizou-se como parâmetro normal de imunexpressão epitélio de mucosa proveniente de biópsias de mucocelos de lábio inferior. Estas foram selecionadas buscando o mínimo de infiltrado inflamatório em lâmina própria, para evitar que os fenômenos celulares gerados por essa inflamação interferissem nos resultados. É possível que o tecido completamente normal apresentasse menor expressão dessas enzimas. Contudo, mesmo com essa limitação, foi observada maior imunorreatividade de HDAC1 e HAT1 na maioria dos casos de CEL comparados a média de porcentagem de imunomarcção dos ENN, e ainda de grande parte casos de HDAC2.

A interpretação dos dados na presente pesquisa é limitada pela própria técnica imuno-histoquímica que não gera uma quantificação tão precisa quanto outras metodologias. Também não permite avaliar a atividade dessas enzimas, assim a expressão pode permanecer em valores normais enquanto a atividade pode estar alterada. Porém, esses resultados podem instigar estudos mais avançados, com metodologias mais específicas como o PCR em tempo real ou Western Blot ou até

mesmo na própria imuno-histoquímica, a aplicação de anticorpos que revelem histonas acetiladas, a fim de aprofundar o conhecimento sobre essas alterações epigenéticas nesse tipo de neoplasia.

O tratamento de escolha do CEL é a excisão cirúrgica com margem de segurança. Quando o diagnóstico é tardio, a cirurgia tende a ser extensa e gera danos funcionais relacionados a dificuldade de vedamento labial, limitando a nutrição e fonação, além do prejuízo estético importante incutindo na diminuição da qualidade de vida do indivíduo. No entanto, o diagnóstico precoce favorece o prognóstico do paciente, um tratamento menos devastador é passível de ser realizado e as taxas de metástases regionais ou recidivas são menores. A confirmação futura destas alterações, facultará a utilização de HDACi no tratamento dessas lesões, evitando ou reduzindo procedimentos cirúrgicos, por vezes, mutiladores.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados dessa pesquisa verificou-se que:

- A expressão de HDAC2 foi estatisticamente maior no grupo de QA em comparação ao grupo dos CEL, sugerindo a sua participação nas fases iniciais da fotocarcinogênese.
- Para as demais proteínas e demais grupos não houve diferença estatística.
- Não houve relação entre a expressão das proteínas com o grau de displasia nas QA, nem com a diferenciação histopatológica nos CEL.
- Tanto no ENN quanto no CEL houve correlação positiva entre a expressão da HAT1 com HDAC1 e com HDAC2.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, H. et al. Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in classical Hodgkin's lymphoma. **Expert Opin Ther Targets**, v. 14, n. 6, p. 577-84, jun. 2010.
- BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. **Pathology & Genetics: Head and Neck Tumours**. Lyon: IARC Press; 2005.
- BEANI, J. C. Ultraviolet A-induced DNA damage: role in skin cancer. **Bull Acad Natl Med**, v. 198, n. 2, p. 273-95, fev. 2014.
- BRASIL, M. D. S. Estimativa: Incidência de Câncer no Brasil 2016/2017. **INCA, Ministério da Saúde**, 2015. Disponível em <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>. Acesso em: 13/12/2015.
- CALCAIANU, N. et al. Surgical attitude in premalignant lesions and malignant tumors of the lower lip. **J Med Life**, v. 8, n. 1, p. 109-11, jan./mar. 2015.
- CHANG, H. H. et al. Histone deacetylase 2 expression predicts poorer prognosis in oral cancer patients. **Oral Oncol**, 2009.
- DEKKER, F. J.; HAISMA, H. J. Histone acetyl transferases as emerging drug targets.. **Drug Discov Today**., v.14, p.942-8, 2009
- DIONNE, K. R. et al. Potentially malignant disorders of the oral cavity: current practice and future directions in the clinic and laboratory. **Int J Cancer**, v. 136, n. 3, p. 503-15, fev. 2015.
- FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 2, p. 143-53, fev. 2004.
- GIAGINIS, C. et al. Clinical significance of histone deacetylase (HDAC)-1, HDAC-2, HDAC-4, and HDAC-6 expression in human malignant and benign thyroid lesions. **Tumour Biol**, v. 35, n. 1, p. 61-71, jan. 2014.

GRANSTEIN, R. D.; MATSUI, M. S. UV radiation-induced immunosuppression and skin cancer. **Cutis**, v. 74, n. 5 Suppl, p. 4-9, nov. 2004.

GRONNIGER, E. et al. Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. **PLoS Genet**, v. 6, n. 5, p. e1000971, mai. 2010.

GRUHN, B. et al. The expression of histone deacetylase 4 is associated with prednisone poor-response in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res**, v. 37, n. 10, p. 1200-7, out. 2013.

HALKIDOU, K. et al. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. **Prostate**, v. 59, n. 2, p. 177-89, mai. 2004.

HAYASHI, A. et al. Type-specific roles of histone deacetylase (HDAC) overexpression in ovarian carcinoma: HDAC1 enhances cell proliferation and HDAC3 stimulates cell migration with downregulation of E-cadherin. **Int J Cancer**, v. 127, n. 6, p. 1332-46, set. 2010.

ISHIHAMA, K. et al. Expression of HDAC1 and CBP/p300 in human colorectal carcinomas. **J Clin Pathol**, v. 60, n. 11, p. 1205-10, nov. 2007.

JADOTTE, Y. T.; SCHWARTZ, R. A. Solar cheilosis: an ominous precursor: part I. Diagnostic insights. **J Am Acad Dermatol**, v. 66, n. 2, p. 173-84; quiz 185-6, fev. 2012.

JURKIN, J. et al. Distinct and redundant functions of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 in proliferation and tumorigenesis. **Cell Cycle**, v. 10, n. 3, p. 406-12, fev. 2011.

KRUSCHE, C. A. et al. Class I histone deacetylase expression in the human cyclic endometrium and endometrial adenocarcinomas. In: (Ed.). **Hum Reprod**. v.22, p.2956-66., 2007.

KRUSCHE, C. A. et al. Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis. **Breast Cancer Res Treat**, v. 90, n. 1, p. 15-23, mar. 2005.

KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol**, v. 42, n. 10, p. 987-93, nov. 2006.

LEE, S. H. et al. Expression of Histone Deacetylases in Diffuse Large B-cell Lymphoma and Its Clinical Significance. **Int J Med Sci**, v. 11, n. 10, p. 994-1000, 2014.

LUGER, K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, n. 6648, p. 251-60, set. 1997.

MARKS, P. A.; XU, W. S. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. **J Cell Biochem**, v. 107, n. 4, p. 600-8, jul. 2009.

MARMORSTEIN, R.; TRIEVEL, R. C. Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities. **Biochim Biophys Acta**, v. 1789, n. 1, p. 58-68, jan. 2009.

MIN, S. K. et al. Expression of HAT1 and HDAC1, 2, 3 in Diffuse Large B-Cell Lymphomas, Peripheral T-Cell Lymphomas, and NK/T-Cell Lymphomas. **Korean J Pathol**, v. 46, n. 2, p. 142-50, abr. 2012.

MULLER, B. M. et al. Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer--overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. **BMC Cancer**, v. 13, p. 215, 2013.

NAKAGAWA, M. et al. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. **Oncol Rep**, v. 18, n. 4, p. 769-74, out. 2007.

PARTHUN, M. R. Histone acetyltransferase 1: more than just an enzyme? **Biochim Biophys Acta**, v. 1819, n. 3-4, p. 256-63, mar./abr. 2013.

PINDBORG, J. et al. **Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa**. Springer, 1997.

ROPERO, S.; ESTELLER, M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. **Mol Oncol**, v. 1, n. 1, p. 19-25, jun. 2007.

ROTH, S. Y.; DENU, J. M.; ALLIS, C. D. Histone acetyltransferases. **Annu Rev Biochem**, v. 70, p. 81-120, 2001.

SASAKI, H. et al. Histone deacetylase 1 mRNA expression in lung cancer. **Lung Cancer**, v. 46, n. 2, p. 171-8, nov. 2004.

SUZUKI, J. et al. Protein acetylation and histone deacetylase expression associated with malignant breast cancer progression. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 9, p. 3163-71, mai. 2009.

TAFROVA, J. I.; TAFROV, S. T. Human histone acetyltransferase 1 (Hat1) acetylates lysine 5 of histone H2A in vivo. **Mol Cell Biochem**, mar. 2014.

THEOCHARIS, S. et al. Histone deacetylase-1 and -2 expression in mobile tongue squamous cell carcinoma: associations with clinicopathological parameters and patients survival. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n. 9, p. 706-14, out. 2011.

VAN LAETHEM, A. et al. The sunburn cell: regulation of death and survival of the keratinocyte. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 8, p. 1547-53, ago. 2005.

VERREAULT, A. et al. Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. **Curr Biol**, v. 8, n. 2, p. 96-108, jan. 1998.

WEICHERT, W. et al. Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. **Br J Cancer**, v. 98, n. 3, p. 604-10, fev. 2008.

YANG, H. et al. Analysis of class I and II histone deacetylase gene expression in human leukemia. **Leuk Lymphoma**, p. 1-8, mai. 2015.

YOO, C. B.; JONES, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 1, p. 37-50, jan. 2006.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (A) Senhor (a) está sendo convidado a participar da pesquisa **“Expressão imunoistoquímica das enzimas HDAC1, HDAC2 e HAT1 em queilites actínicas e carcinomas de células escamosas labiais”**, a ser desenvolvida pela cirurgiã-dentista **Emanuely da Silva Chrun**, aluna do Curso de Mestrado em Odontologia/UFSC, sob orientação do **Prof. Dr. Filipe Ivan Daniel**. O (a) Sr. (a) apresentou, no passado, uma lesão no lábio, que recebeu diagnóstico e/ou tratamento na UFSC. Para que isso acontecesse, foi colhido um material durante uma cirurgia para retirar essa lesão, esse material foi utilizado para determinar o diagnóstico e ele ficou guardado na UFSC. Para participar desse trabalho, será necessário que o (a) senhor (a) autorize a utilização de uma pequena parte desse material já arquivado.

Objetivo: Este trabalho pretende pesquisar a presença de certas substâncias (enzimas chamadas HDAC1, HDAC2 e HAT1), por meio de uma técnica chamada imunoistoquímica.

Metodologia: Assinando esse termo o (a) Sr. (a) concorda em participar desse trabalho permitindo o acesso ao material pertencente ao senhor, que está armazenado na UFSC, e também às informações que estão nas fichas de biópsia, sobre o seu caso. Não haverá a necessidade de uma nova cirurgia para a coleta do material.

Benefícios: Os benefícios esperados envolvem a produção de conhecimento científico podendo servir de base para outros estudos, e possivelmente tentar ajudar os próximos pacientes que tenham a mesma doença no futuro, facilitando o seu diagnóstico.

Desconfortos/Riscos: Durante a pesquisa será apenas utilizado o material resultante da biópsia da lesão, previamente realizada, e armazenado nos arquivos do LPB (Laboratório de Patologia Bucal), sem causar os desconfortos daquela cirurgia que já foi realizada. Como haverá acesso aos seus dados, há um risco de perda de sigilo dessas informações, mas os pesquisadores garantem que tomarão todos os cuidados para evitar que isso ocorra.

Outras informações: O (A) Sr. (a) tem a garantia que receberá respostas ou esclarecimentos a todas as suas perguntas sobre os assuntos relacionados à pesquisa, por meio do contato com os pesquisadores, que assumem o compromisso de proporcionar informações atualizadas obtidas durante o estudo. O (A) Sr. (a) não terá nenhuma despesa decorrente desta pesquisa e tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, sem qualquer represália/prejuízo ao seu atendimento, através dos telefones (48) **37219473/91909480** (pesquisadores) ou e-mail emanuely.silva@gmail.com. Os pesquisadores declaram que cumprirão as exigências contidas na Resolução CNS 466/2012 (especialmente nos itens IV.3 e IV.4), que o sigilo/privacidade dos participantes será garantido durante todas as etapas da pesquisa, inclusive na divulgação dos resultados, que os participantes terão direito ao ressarcimento de eventuais despesas e indenização diante de

eventuais danos produzidos pela pesquisa. O telefone de contato do Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC é **37219206**, caso seja necessário contato.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu,

_____, portador (a) do RG/CPF _____ concordo em participar desta pesquisa, bem como com a utilização dos dados coletados, desde que seja mantido o sigilo de minha identificação, conforme normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. A minha participação é voluntária podendo ser suspensa a qualquer momento. Pelo presente consentimento, declaro que fui esclarecido (a) sobre a pesquisa a ser realizada, de forma detalhada, livre de qualquer constrangimento e obrigação, e que recebi uma cópia deste termo, assinada pelos pesquisadores.

Florianópolis, ____ de _____ de 2015.

Assinatura do participante

Emanuely da Silva Chrun
Pesquisadora Participante
(48)9190-9480
emanuely.silva@gmail.com

Filipe Ivan Daniel
Pesquisador Principal
(48)3721-9473
filipe.daniel@ufsc.br

ANEXO A – Parecer consubstanciado

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS HDAC1, HDAC2 E HAT1 EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS LABIAIS POR IMUNOISTOQUÍMICA

Pesquisador: FILIPE IVAN DANIEL

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 42682915.2.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.020.518

Data da Relatoria: 30/03/2015

Apresentação do Projeto:

Este é um estudo descritivo, observacional do tipo caso-controle, em que será realizada reação imunoistoquímica para os anticorpos HDAC1, HDAC2 e HAT1, em 30 espécimes de tecido não-neoplásico de lábio, 30 espécimes de lesão potencialmente cancerizável do tipo quelite actínica e 30 de carcinoma de células escamosas labial, para cada anticorpo. Esse material encontra-se armazenado no arquivo de diagnósticos do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC e participará da pesquisa frente à concordância dos pacientes através do termo de consentimento livre e esclarecido, anexo no formulário.

Hipótese:

Os tecidos pre-neoplásicos e neoplásicos apresentam progressivamente maior expressão das HDAC e menor de HAT, quando comparado com o tecido não-neoplásico. Avaliar essa expressão poderá ser útil para facilitar o diagnóstico de tais lesões, especialmente nos casos de difícil definição diagnóstica, possivelmente também como marcador de prognóstico e serviria como alvo de medicamentos anti-neoplásicos, que já foram desenvolvidos e estão sendo utilizados para tratamento de outros tumores malignos.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), R. Desembargador Vitor Lima,	
Bairro: Trindade	CEP: 88.040-400
UF: SC	Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-8094	E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.020.515

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo deste trabalho é investigar a expressão de HDAC1, HDAC2 e HAT1 em tecido não-neoplásico, lesões pré-cancerosas tipo queratite actínica (QA) e carcinoma espinocelular (CEC) de lábio.

Objetivo Secundário:

• Determinar a expressão das proteínas HDAC1, HDAC2 e HAT1 em tecido não-neoplásico, QA e CEC de lábio, através de imunohistoquímica; • Determinar a localização intracelular das proteínas HDAC1, HDAC2 e HAT1 nos tecidos em estudo, por meio de imunohistoquímica; • Comparar a expressão das proteínas entre os grupos estudados; • Comparar a expressão da HDAC1, HDAC2 e da HAT1 com a diferenciação celular nos CECs de lábio e com o grau de displasia epitelial nas QAs.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Durante a pesquisa será apenas utilizado o material resultante da biópsia da lesão, previamente realizada, e armazenado nos arquivos do LPB (Laboratório de Patologia Bucal). Assim, não haverá nova intervenção cirúrgica no paciente e o mesmo não será submetido a desconfortos locais ou riscos cirúrgicos. Porém, como haverá acesso aos dados do paciente, há um risco de perda de sigilo dessas informações, mas os pesquisadores garantem que tomarão todos os cuidados para evitar que isso ocorra.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa em tela é relevante e deve ser efetuada porque se volta para pesquisar o câncer bucal. Logo descobrir seus comportamentos é de grande importância porque envolvem a produção de conhecimento científico podendo servir de base para outros estudos, e possivelmente tentar ajudar pacientes que tenham a mesma doença no futuro, facilitando o seu diagnóstico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termo de apresentação obrigatória está bem elaborado. Aborda o método e toma todos os cuidados para esclarecer as pessoas envolvidas na pesquisa. É documento claro, objetivo e esclarecedor.

Recomendações:

Não encontramos motivos para apontar recomendações, uma vez que julgamos tratar-se de um projeto muito bem elaborado.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), R. Desembargador Vitor Lima,
Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.020.518

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está muito bem elaborado. Cita ainda que as despesas decorrem do uso de reagentes e que os mesmos já constam no Laboratório de Patologia Bucal da UFSC.

Por o projeto atender as normas em vigor e por estar de acordo com o se exige para seu trâmite, onde constam todos os anexos somos de parecer favorável a sua aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FLORIANOPOLIS, 13 de Abril de 2015

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), R. Desembargador Vitor Lima,
Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br